

Initial -

PATENT COOPERATION TREATY

RECEIVED

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

AUG 31 2001

To:

TECH CENTER 1600/2900

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 23 May 2001 (23.05.01)	
International application No. PCT/JP00/06359	Applicant's or agent's file reference PCT125
International filing date (day/month/year) 18 September 2000 (18.09.00)	Priority date (day/month/year) 17 September 1999 (17.09.99)
Applicant FURUSAKO, Shouji et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

12 April 2001 (12.04.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Antonia Muller

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

47
Translation
09/808/58

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PCT125	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/06359	International filing date (day/month/year) 18 September 2000 (18.09.00)	Priority date (day/month/year) 17 September 1999 (17.09.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 33/53, 33/68, 33/577, C07K 16/28, 14/705		
Applicant MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

RECEIVED

MAY 16 2002

TECH CENTER 1609/2900

RECEIVED
MAR 21 2002
3700 MAIL ROOM

Date of submission of the demand 12 April 2001 (12.04.01)	Date of completion of this report 08 May 2001 (08.05.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/06359

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/06359

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 4

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 4 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

The subject matter of claim 4 relates to a diagnostic method.

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

- ☒ no international search report has been established for said claims Nos. 4

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

- ☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.
- ☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

THIS PAGE BLANK (SEE P. 2)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/06359

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-3,5-14	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-3,5-14	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-3,5-14	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations**Claims 1-3 and 5-14**

None of the documents cited in the ISR describes an antibody to a soluble CD14 with a low molecular weight, a hybridoma, or a fractional determination method, etc. They are not obvious to a person skilled in the art either.

THIS PAGE BLANK

特 許 協 力 条 約

RECEIVED

AUG 31 2001

TECH CENTER 1600/2900

REC'D 28 MAY 2001

WIPO

PCT

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)

[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 PCT125	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/06359	国際出願日 (日.月.年) 18.09.00	優先日 (日.月.年) 17.09.99
国際特許分類 (IPC) Int. Cl ⁷ G01N33/53, 33/68, 33/577, C07K16/28, 14/705		
出願人 (氏名又は名称) 持田製薬株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。

☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☒ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 12.04.01	国際予備審査報告を作成した日 08.05.01	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 亀田 宏之	2 J 9015
電話番号 03-3581-1101 内線 3252		

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (1998年7月)

THIS PAGE BLANK (USF-10)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

THIS PAGE BLANK (REV)

1. 次に関して、当該請求の範囲に記載されている発明の新規性、進歩性又は産業上の利用可能性につき、次の理由により審査しない。

- ☒ 請求の範囲 4

診断方法である。

- ☐ フレキシブルディスクによる配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1-3, 5-14	有
	請求の範囲		無
進歩性 (IS)	請求の範囲	1-3, 5-14	有
	請求の範囲		無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-3, 5-14	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

請求の範囲 1-3, 5-14

国際調査報告に列記されたいずれの文献にも、低分子量の可溶性CD14に対する抗体、ハイブリドーマ、分別測定方法等について記載されておらず当業者にとって自明でもない。

THIS PAGE BLANK (USPTO)



P.B.5818 - Patentlaan 2
2280 HV Rijswijk (ZH)
☎ +31 70 340 2040
TX 31651 epo nl
FAX +31 70 340 3016

Europäisches
Patentamt

Zweigstelle
in Den Haag
Recherchen-
abteilung

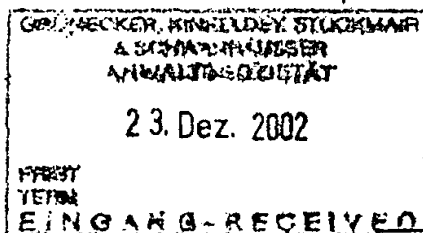
European
Patent Office

Branch at
The Hague
Search
division

Office européen
des brevets

Département à
La Haye
Division de la
recherche

Grünecker, Kinkeldey,
Stockmair & Schwanhäusser
Anwaltssozietät
Maximilianstrasse 58
80538 München
ALLEMAGNE



Datum/Date

20.12.02

Zeichen/Ref./Réf.

EP23859-031/gr

Anmeldung Nr./Application No./Demande n°/Patent Nr./Patent No./Brevet n°.

00961061.9-2401-JP0006359

Anmelder/Applicant/Demandeur/Patentinhaber/Propriétaire/Titulaire

MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

COMMUNICATION

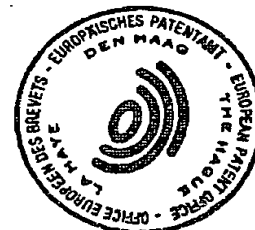
The European Patent Office herewith transmits as an enclosure the European search report for the above-mentioned European patent application.

If applicable, copies of the documents cited in the European search report are attached.

☒ Additional set(s) of copies of the documents cited in the European search report is (are) enclosed as well.

REFUND OF THE SEARCH FEE

If applicable under Article 10 Rules relating to fees, a separate communication from the Receiving Section on the refund of the search fee will be sent later.



THIS PAGE BLANK (USPTO)



European Patent
Office

**SUPPLEMENTARY
PARTIAL EUROPEAN SEARCH REPORT**

Application Number

which under Rule 45 of the European Patent Convention EP 00 96 1061 shall be considered, for the purposes of subsequent proceedings, as the European search report

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.7)
X	LANDMANN R ET AL: "SOLUBLE CD14 ACTIVATES MONOCYTIC CELLS INDEPENDENTLY OF LIPOPOLYSACCHARIDE" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. WASHINGTON, US, vol. 66, no. 5, May 1998 (1998-05), pages 2264-2271, XP000882503 ISSN: 0019-9567	5-8,11	G01N33/53 G01N33/68 G01N33/577 C07K16/28 C07K14/705
Y	* big2, big6-7, and big16 antibodies * * page 2276, column 1 *	1-4,9, 10,12-14	
X	WO 96 32418 A (OM LAB SA ; LAUENER ROGER PASCAL (CH); DEUTSCHE OM ARZNEIMITTEL GMB) 17 October 1996 (1996-10-17)	5-8,11	
Y	* 63D3, 3B9 and 2D11 antibodies * * the whole document *	1-4,9, 10,12-14	
	--- -/--		
			TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.7)
			G01N C07K
The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search.			
INCOMPLETE SEARCH			
The Search Division considers that the present application, or some or all of its claims, does/do not comply with the EPC to such an extent that a meaningful search into the state of the art cannot be carried out, or can only be carried out partially, for the following claims:			
Claims searched completely :			
Claims searched incompletely :			
Claims not searched :			
Reason for the limitation of the search:			
Although claims 1-4 and 14 embrace a diagnostic method practised on the human/animal body (Article 52(4) EPC), the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.			
Place of search		Date of completion of the search	Examiner
MUNICH		13 December 2002	Hillenbrand, G
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS			
X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document			
T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document			

1
EPO FORM 1503 03.82 (P04C20)

THIS PAGE BLANK (USPTO)



European Patent
Office

PARTIAL EUROPEAN SEARCH REPORT

Application Number
EP 00 96 1061

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.7)
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	
A v ③	FERRERO E ET AL: "NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE GENE ENCODING THE MONOCYTE DIFFERENTIATION ANTIGEN, CD14" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 16, no. 9, 1988, page 4173 XP002916988 ISSN: 0305-1048 * the whole document * -----		
			TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.7)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

EP 00 96 1061

13-12-2002

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9632418 A	17-10-1996	AU WO	30-10-1996 17-10-1996
<hr/>			

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1005 EP



PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 PCT125	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/06359	国際出願日 (日.月.年) 18.09.00	優先日 (日.月.年) 17.09.99
出願人(氏名又は名称) 持田製薬株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☒ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☒ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 _____ 4 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
診断方法である。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/53, 33/68, 33/577, C07K16/28, 14/705

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/53, 33/68, 33/577, C07K16/28, 14/705

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2000年
日本国登録実用新案公報	1994-2000年
日本国実用新案登録公報	1996-2000年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS, JOIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 5-501399, A (スクリップス クリニック アンド リサーチ ファウンデーション) 18. 3月. 1993 (18. 03. 93) & EP, 485430, A	1-3, 5-14
A	JP, 8-510909, A (ザ スクリップス リサーチ イン スティチュート) 19. 11月. 1996 (19. 11. 96) & EP, 751962, A	1-3, 5-14
A	JP, 10-505839, A (ザ スクリップス リサーチ イ ンスティチュート) 9. 6月. 1998 (09. 06. 98)	1-3, 5-14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06. 12. 00

国際調査報告の発送日

19.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

亀田 宏之

2J

9015

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	& EP, 7 9 2 1 6 2, A	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年3月29日 (29.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/22085 A1

- (51) 国際特許分類⁷: G01N 33/53, Kamon) [JP/JP]; 〒160-8515 東京都新宿区四谷1丁目7番地 持田製薬株式会社内 Tokyo (JP).
33/68, 33/577, C07K 16/28, 14/705
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/06359 (74) 代理人: 渡辺望稔, 外(WATANABE, Mochitoshi et al.); 〒101-0032 東京都千代田区岩本町2丁目12番5号 早川トナカイビル3階 Tokyo (JP).
- (22) 国際出願日: 2000年9月18日 (18.09.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): CA, JP, US.
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- (30) 優先権データ: 特願平11/264474 1999年9月17日 (17.09.1999) JP 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 持田製薬株式会社 (MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒160-8515 東京都新宿区四谷1丁目7番地 Tokyo (JP). 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 古迫正司 (FURUSAKO, Shouji) [JP/JP]. 白川嘉門 (SHIRAKAWA,

(54) Title: METHOD OF FRACTIONAL MEASUREMENT OF SOLUBLE CD14 PROTEIN

(54) 発明の名称: 可溶型CD14蛋白質の分別測定方法

(57) Abstract: A method of fractional quantification of a soluble CD14 protein having a low molecular weight; an antibody specific to a soluble CD14 protein having a high molecular weight; and a method of highly sensitively, conveniently and specifically measuring a soluble CD14 protein having a high molecular weight, either qualitatively or quantitatively, by using this antibody.

(57) 要約:

本発明は、低分子量の可溶型CD14蛋白質の分別定量方法を提供する。本発明はまた、高分子量の可溶型CD14蛋白質の特異的抗体を提供する。本発明はさらに、この抗体を用いて高分子量の可溶型CD14蛋白質を高感度、簡便かつ特異的に定性または定量する測定方法を提供する。

WO 01/22085 A1

THIS PAGE BLANK (USPTO,

明 細 書

可溶型CD14蛋白質の分別測定方法

技術分野

本発明は低分子量の可溶型CD14蛋白質の分別定量方法に関する。具体的には体液中の可溶型CD14蛋白質の総量を測定し、高分子量の可溶型CD14蛋白質特異的測定系で測定した高分子量の可溶型CD14蛋白質の量を差し引くことにより、低分子量の可溶型CD14蛋白質を分別定量する方法に関する。本発明はまた、前記分別測定方法を用いた敗血症の診断方法に関する。本発明はまた、高分子量の可溶型CD14蛋白質のC末端部に特異的に結合性を有する抗体、それを産生する細胞及び該抗体の用途に関する。さらに具体的には、高分子量の可溶型CD14蛋白質配列のうち316番目のグリシンより356番目のアラニンまでの領域に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマに関する。本発明はさらに、高分子量の可溶型CD14蛋白質配列のうち316番目のグリシンより356番目のアラニンまでの41個のアミノ酸配列のうちの、いずれか連続した6～41アミノ酸からなるポリペプチドに関する。本発明はさらに、該低分子量の可溶型CD14蛋白質の分別定量方法の高分子量の可溶型CD14蛋白質の量を測定する工程における該モノクローナル抗体の使用に関する。本発明はさらに、該モノクローナル抗体を用いた高分子量の可溶型CD14蛋白質を特異的に定性または定量する測定方法に関する。

背景技術

1990年、Wrightらは単核球の膜上に発現されているCD14と命名された53kDaの糖蛋白質が、エンドトキシンであるLPSのレセプターであることを明らかにした（Science 249:1431頁，1990年）。このCD14蛋白質は、膜結合型CD14蛋白質（以下mCD14蛋白質ともいう）のほかに可溶型CD14蛋白質（以下sCD14蛋白質または可溶性CD14蛋白質ともいう）がある。そして血中には分子量の異なる複数の可溶型CD14蛋白質が存在することが報告されている（Labetta MO, Eur. J. Immunol., 23, 2144, 1993）。これら可溶型CD14蛋白質は、膜上のCD14蛋白質が細胞の活性化に伴い放出され则认为られていた。ところが最近、ヒト初代肝細胞および肝細胞株でmCD14蛋白質が発現していることが報告された（Sugl, J. Hepatology, 31, 435, 1999）。また、CD14蛋白質の遺伝子の5' および3' フランキング領域を含む80kbのゲノミックヒトCD14蛋白質を導入したトランスジェニックマウスでは、単球/マクロファージばかりでなく肝細胞にもmCD14蛋白質が発現していた（Hetherington C等, J. Immunol., 162, 503, 1999）。また従来より、sCD14蛋白質が血中のLPSを捕捉しHDLに輸送することにより肝臓でクリアランスしていると考えられている（J. Exp. Med., 181, 1743, 1995）。

このように可溶型CD14蛋白質の生理学的機能として、LPSを直接および間接的にクリアランスする一方、LPSとsCD14蛋白質が結合した複

合体 (sCD14 蛋白質/LPS) は、マクロファージ上のmCD14 蛋白質を介してマクロファージを著しく活性化させて、炎症性サイトカインを誘導することも報告されている (Hailmann E等、J. Immunol.、156、4384、1996)。さらに、sCD14 蛋白質/LPSは血管内皮細胞や血管平滑筋細胞の細胞死と炎症性サイトカインの産生を誘導する (Loppnow H等、Infection & Immunity、63、1020、1995)。これら血管内皮細胞や血管平滑筋細胞はmCD14 蛋白質を持たないことが確認されており、sCD14 蛋白質/LPSを認識する受容体の存在が示唆されていた (Tobias等J. Exp. Med.、178、2193、1993)。またGPIの生合成不全患者であるヘモグロビン夜尿症 (PNH) 患者の内皮細胞も、sCD14 蛋白質によりLPS応答性を持つとの報告もある (J. Lab. Clin. Med.、125、662、1995)。

また最近CD14 蛋白質がPhosphatidilserineを認識し、アポトーシスをおこした細胞の除去に寄与していることが分かり、LPS受容体としての機能以外の機能が明らかにされた (Devitt A、Nature、392、505、1998)。またM. Labeta等は、sCD14 蛋白質がT細胞活性化抑制活性を持つことを報告している (M. Labeta等、Eur. J. Immunol. 29、265、1999)。

可溶型CD14 蛋白質は敗血症患者や外傷患者、火傷患者、リウマチ患者血清や尿で増加することが報告されLPSの排除やLPSシグナル伝達に関与していると考えられている。また、Landmannらは、敗血症患者血清の可溶型CD14 蛋白質のウエスタン分析を行い、高分子量の可溶型CD14 蛋白質が

敗血症死亡例や発作性夜行性ヘモグロビン尿症（PNH）患者で高値であり、また正常血清中には敗血症死亡例で検出された高分子量の可溶型CD14蛋白質は検出されなかったことを報告している（The Journal of Infectious Disease, 171巻, 639頁, 1995年）。この分子量の異なるサブタイプについては、糖鎖の違いが関与していること、またNおよびO結合型糖鎖を除去してもなお2種の異なる分子量の可溶型CD14蛋白質が血中に存在することをStelzerらが報告している（Eur. J. Biochem. 236巻, 457頁, 1996年）。またBuflerらは可溶型CD14蛋白質のC末端分析を行い可溶型CD14蛋白質の327番のセリン残基にGPI基が結合すること、約56 kDaの分子量を持つ可溶型CD14蛋白質はGPIアンカリングされない分子種であることを報告している（Eur. J. Immunol., 25巻, 604頁, 1995年）。

上述したように、血中の高分子量の可溶型CD14蛋白質のサブタイプが敗血症患者の重症例の血清で高値となることが報告されていること等、可溶型CD14蛋白質の測定が臨床上有用であることが示唆されている。しかしながら、これらの解析はウエスタン法によるものであり、複雑な操作過程が必要で、感度も高くないため、実用的でないという問題点があった。すなわち、高感度で簡便な特異的測定法が存在しないために可溶型CD14蛋白質測定の臨床上の有用性を証明することができなかった。故に、これら高分子量の可溶型CD14蛋白質を臨床上の有用性を証明するため、これらを高感度、簡便かつ特異的に測定する方法の開発が必要であった。

可溶型CD14蛋白質に対する抗体はBazilらの作製したMEM-18（

Eur. J. Immunol., 16巻、1583頁、1986年)、Shuttらの作製したRoMo-1 (Allerg. Immunol. (Leipz), 34巻、1号、17頁、1988年)、Steinmanらの作製した3C10 (J. Exp. Med., 158巻、1号、126頁、1983年)をはじめ、多くの抗CD14蛋白質抗体が作製されている。また、特表平8-510909には28C5または23G4等が開示されている。

3C10、MEM-18、28C5または23G4は、LPSのCD14蛋白質への結合を阻害する活性を有することが明らかになっている。特に、3C10及びMEM-18は、それぞれの結合領域がアミノ末端側、すなわちLPSの結合領域である配列番号1に記載の7~14番目 (J. Biol. Chem., 270巻、29号、17237頁、1995年)、及び57~64番目 (J. Biol. Chem., 270巻、10号、5219頁、1995年)のアミノ酸に存在することを報告している。また、これら抗体を用いた可溶型CD14蛋白質の測定系も作製され (J. Immunol. Methods, 155巻、225頁、1992年) ている。これら抗体を用いた測定系はアミノ末端を認識する抗体を使用するため、測定される血中の可溶型CD14蛋白質は血中に存在する全ての可溶型CD14蛋白質 (以下N末端に特異性を有する抗体で測定した可溶型CD14蛋白質を総量と記載する) である。すなわち、これまで報告されている可溶型CD14蛋白質の抗体は、血中に存在する全ての可溶型CD14蛋白質を認識するものであり、高分子量の可溶型CD14蛋白質を特異的に認識するものではなく、これらの抗体を用いて上記高分子量の可溶型CD14蛋白質の特異的測定を行うことはできない。

さらに、本発明者等は可溶型CD14蛋白質（1-285）および血中の低分子量の可溶型CD14 36 kDa蛋白質に炎症性サイトカインの誘導を抑制する作用があることを特許願2000-099617号明細書に報告しており、血中の低分子量の可溶型CD14 36 kDa蛋白質はその生理学的機能として、LPSを直接および間接的にクリアランスする一方、LPSとsCD14蛋白質が結合した複合体（sCD14蛋白質/LPS）が、マクロファージ上のmCD14蛋白質を介してマクロファージを著しく活性化させて、炎症性サイトカインを誘導するのを抑制すると考えられている。さらに、sCD14蛋白質/LPSはmCD14蛋白質を持たない血管内皮細胞や血管平滑筋細胞の細胞死と炎症性サイトカインの産生を誘導することから、低分子量の可溶型CD14 36 kDa蛋白質は血管内皮細胞や血管平滑筋細胞の傷害を同様に抑制すると考えられている。以上のことから、敗血症患者ではLPS刺激によりマクロファージ上のmCD14蛋白質の産生が増強され、その後プロテアーゼにより切断され、低分子量の可溶型CD14蛋白質が産生される機構の存在が推定され、低分子量の可溶型CD14蛋白質は細胞の傷害を抑制するための生体の防御因子として働いていると予想されている。従って、敗血症患者における低分子量の可溶型CD14蛋白質（36 kDa）の上昇はLPS刺激により開始される生体内の防御機能であり、それが破綻したときに敗血症患者の状態が悪化すると考えられている。

すなわち、高分子量の可溶型CD14蛋白質と同様に、低分子量の可溶型CD14蛋白質の測定も臨床上有用であることが示唆されている。しかし、これまでに報告されている可溶型CD14蛋白質抗体は、低分子量の可溶型CD14蛋白

質についても特異的に認識できず、さらに、詳しくは発明の開示において述べるが、低分子量の可溶型CD14蛋白質を特異的に認識する抗体の作製は、高分子量のCD14蛋白質を特異的に認識する抗体の作製より、さらに困難である。そのため、低分子量の可溶型CD14蛋白質を高感度、簡便かつ特異的に測定する方法の開発が必要であった。

発明の開示

以上より、本発明の課題は、高分子量の可溶型CD14蛋白質の特異的抗体を提供することである。またこの抗体を用いて、高分子量の可溶型CD14蛋白質を高感度、簡便かつ特異的に定性または定量する測定方法を提供し、併せて低分子量の可溶型CD14蛋白質を定性または定量する測定方法を提供することである。

発明者等は鋭意研究の結果、高分子量の可溶型CD14蛋白質を特異的に認識する抗体を作製し、高分子量の可溶型CD14蛋白質を特異的に測定することに成功した。本抗体および作製した測定系を用いて血中の可溶型CD14蛋白質の解析を行ったところ、Landmannらの報告とは異なり、正常人の血中の可溶型CD14蛋白質の主要な分子種は高分子量の可溶型CD14 49 kDa蛋白質とCD14 55 kDa蛋白質であることを明らかにした。また、血中にはわずかながら低分子量の可溶型CD14 36 kDa蛋白質も存在し、正常人では少なく、敗血症患者において増加することも明らかにした。

低分子量の可溶型CD14蛋白質は、高分子量の可溶型CD14蛋白質が生体内でC末端が切断された蛋白質であり、そのアミノ酸配列は高分子量の可溶

型CD 1 4蛋白質に保存されている配列である。すなわち、低分子量の可溶型CD 1 4蛋白質はアミノ酸配列が、高分子量の可溶型CD 1 4蛋白質の一部と全く同じ配列である。このため、本発明の抗体およびこれまでに知られている抗体は高分子量の可溶型CD 1 4蛋白質のみを認識する抗体であるか高分子量の可溶型CD蛋白質及び低分子量の可溶型CD 1 4蛋白質の両方を同時に認識する抗体であり、低分子量の可溶型のCD 1 4蛋白質のみを認識する抗体は知られていない。

上記に記載の通り、低分子量の可溶型CD 1 4蛋白質のみを特異的に認識する抗体は、現在のところ知られておらず、また一次配列の解析からこのような抗体を作製することも困難である。また、低分子量の可溶型CD 1 4蛋白質の主な蛋白質である可溶型CD 1 4 36 kDa蛋白質は本発明者により明らかになったもので、その構造の特異性に関する知見は全く無く、今後の低分子量の可溶型CD 1 4蛋白質のみを特異的に認識する抗体を作製することができかどうかについて全く不明である。

従って、本発明者等は従来の抗体で測定された可溶型CD 1 4蛋白質のすなわち、可溶型CD 1 4蛋白質の総量から、本発明者等が作製した高分子量の可溶型CD 1 4たんぱく質のみを特異的に認識する抗体を用いる高分子量の可溶型CD 1 4蛋白質の特異的測定系で測定した高分子量の可溶型CD 1 4蛋白質の量を差し引くことにより低分子量の可溶型CD 1 4蛋白質を求める方法を考案し、本発明を完成した。

以下、より具体的に説明する。

先に記載のとおり、ヒトの血中には大きく3種類の可溶型CD 1 4蛋白質が存

在し、それぞれの分子量は55 kDa、49 kDa、36 kDaである。本発明者らは、血中の可溶型CD14蛋白質の解析を行い、高分子量の可溶型CD14 49 kDa蛋白質と可溶型CD14 55 kDa蛋白質が主要な部分を占め、低分子量の可溶型CD14 36 kDa蛋白質はわずかししか含まれないことを解明した。

本発明者等は鋭意研究の結果、配列番号1に記載の高分子量の可溶型CD14蛋白質を特異的に認識する抗体、その抗体のエピトープとなり得るポリペプチド、その抗体を産生するハイブリドーマ、その抗体を用いた高分子量の可溶型CD14蛋白質を高感度、簡便かつ特異的に定性または定量する測定方法、及びその測定方法を用いた低分子量の可溶型CD14蛋白質が関与している疾病の診断方法を開発し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、下記の測定方法、診断方法、ポリペプチド、抗体、ハイブリドーマで構成される。

- (1) 体液中の低分子量の可溶型CD14蛋白質の分別測定方法。
- (2) (A) ~ (C) の工程を含む (1) の分別測定方法。
 - (A) 可溶型CD14蛋白質の総量を測定する工程、
 - (B) 高分子量の可溶型CD14蛋白質を特異的に測定する系により高分子量の可溶型CD14蛋白質の量を測定する工程、および
 - (C) 可溶型CD14蛋白質の総量から、高分子量の可溶型CD14蛋白質の量を差し引く工程。
- (3) 低分子量の可溶型CD14蛋白質が可溶型CD14 36 kDa蛋白質である (1) または (2) の分別測定方法。

(4) 体液中の低分子量の可溶型CD14蛋白質を測定することを含む敗血症の診断方法。

(5) 高分子量の可溶型CD14蛋白質に結合し、低分子量の可溶型CD14蛋白質には結合しない抗体。

(6) 配列番号1に記載のアミノ酸配列からなる全長可溶型CD14蛋白質のC末端41アミノ酸部分のいずれかに結合する(4)の抗体。

(7) C末端41アミノ酸部分のいずれかが配列番号1に記載の316番目から328番目のアミノ酸配列または331番目から345番目のアミノ酸配列である(5)の抗体。

(8) 高分子量の可溶型CD14蛋白質に結合し、配列番号1に記載の1番目から315番目のアミノ酸配列の部分には結合しない(5)～(7)の抗体。

(9) 高分子量の可溶型CD14蛋白質が可溶型CD14 49 kDa蛋白質及び/または可溶型CD14 55 kDaであり、低分子量の可溶型CD14蛋白質が可溶型CD14 36 kDa蛋白質である(5)の抗体。

(10) 配列番号1に記載のアミノ酸配列の316番目から356番目の41個のアミノ酸配列において、連続した6～41アミノ酸からなるポリペプチド。

(11) (5)～(9)の抗体を産生するハイブリドーマ。

(12) (5)～(9)の抗体を使用することを特徴とする高分子量の可溶型CD14蛋白質を特異的に定性または定量する方法。

(13) (B)の工程に、(12)の高分子量の可溶型CD14蛋白質を特異的に定量する方法を含むことを特徴とする(2)の分別測定方法。

図面の簡単な説明

図1は、モノクローナル抗体F1033-3-1及びF1025-3-1の特異性を、免疫原として用いたペプチドキャリア（KLH、ペプチド13、ペプチド15）との反応性により、ELISA法で測定した結果を示したものである。

図2は、モノクローナル抗体（F1033-3-1抗体及びF1025-3-1抗体）の特異性を、組換えヒトCD14蛋白質との反応性により、ELISA法で測定した結果を示したものである。PBS、タイプA、タイプB及タイプCはそれぞれ抗原なし、全長から28アミノ酸短いタイプの高分子量の可溶型CD14蛋白質、高分子量の全長可溶型CD14蛋白質及び全長から41アミノ酸短いタイプの高分子量の可溶型CD14蛋白質に対する反応性を示したものである。

図3は、モノクローナル抗体F1033-3-1とF1023-1-1抗体を用いたサンドイッチELISA系の特異性を、組換えヒトCD14蛋白質との反応性により、ELISA法で測定した結果を示したものである。タイプA、タイプBは全長から28アミノ酸短い高分子量の可溶型CD14蛋白質、高分子量の全長可溶型CD14蛋白質に対する反応性を示したものである。

図4は、モノクローナル抗体F1025-3-1とF1023-1-1抗体を用いたサンドイッチELISA系の特異性を、組換えヒトCD14蛋白質との反応性により、ELISA法で測定した結果を示したものである。タイプA、タイプBは全長から28アミノ酸短い高分子量の可溶型CD14蛋白質、高分子量の全長可溶型CD14蛋白質に対する反応性を示したものである。

図5は、敗血症患者の可溶型CD14蛋白質をIBL社キットで測定した全ての可溶型CD14蛋白質とモノクローナル抗体F1033-3-1とF1023-1-1抗体を用いたサンドイッチELISA系により測定したCD14 55 kDa蛋白質の関係を示したものである。

図6はヒト血清由来可溶型CD14蛋白質を分離精製したものを抗CD14蛋白質抗体で検出したウエスタンブローディングの結果を示したものである。

図7は、IBL社のキットで測定した可溶型CD14蛋白質の総量よりモノクローナル抗体F1023-1-1とF1025-3-1抗体を用いたサンドイッチELISA系で測定した高分子量の可溶型CD14蛋白質の量を差し引いて求めた低分子量の可溶型CD14蛋白質の正常人と敗血症患者の結果を示したものである。

発明を実施するための最良の形態

以下にさらに詳細に本発明を説明する。

本発明の第一の態様は高分子量の可溶型CD14蛋白質に結合し、低分子量の可溶型CD14蛋白質には結合しない抗体である。高分子量の可溶型CD14蛋白質とは、ヒトCD14蛋白質のN末端シグナルペプチドがプロセシングされ、細胞外に分泌もしくは表出された可溶型CD14蛋白質であり、配列番号1に記載の356アミノ酸残基からなるヒト全長可溶型CD14蛋白質及び、その蛋白質から41アミノ酸以下のC末端がプロセシングされた蛋白質が、高分子量の可溶型CD14蛋白質である。また、ヒトにはアレル変異の多様性が知られており、これらの蛋白質に1個または数個のアミノ酸が置換、欠失または付加され

た蛋白質も、高分子量の可溶型CD14蛋白質に含まれる。これらの主たる蛋白質は、可溶型CD14 55 kDa蛋白質及び可溶型CD14 49 kDa蛋白質であるが、これらに限定されるものではない。

また、低分子量の可溶型CD14蛋白質はヒト全長可溶型CD14蛋白質からC末端が42アミノ酸以上欠失した蛋白質である。また、上記と同様に、これらの蛋白質に1個または数個のアミノ酸が置換、欠失または付加された蛋白質も、低分子量の可溶型CD14蛋白質に含まれる。これらの主たる蛋白質は、実施例11および図6に示すようにヒト血中における解析では、36 kDaの蛋白質である。しかし、実施例12に示すようにヒト尿中の解析ではメインの36 kDaの蛋白質の他にも複数のバンドも確認されていることから、限定されるものではない。

GarnierらのGOR IV法 (Methods in Enzymology, 266巻, 540頁, 1996年) を用いて、human CD14蛋白質の2次構造予測を行った結果、312-314番目のアミノ酸残基および329-330番目のアミノ酸残基においてβシートを形成しており、さらにhuman、bovine、rabbit、mouseおよびratの5種類のCD14蛋白質のアミノ酸配列をCLUSTALWのmultiple alignmentを行った結果、315番目から329番目のアミノ酸が欠損していた。種間で配列が保存されていないことと前者の構造予測から315番目のプロリンから328番目のグリシンまでのペプチド部分はループを形成している可能性があり、蛋白分解酵素の感受性が高い構造であった。すなわち、CD14蛋白質はこの部分で分解され、血中に放出された蛋白質が低分子量の可溶

型CD14蛋白質である。

この高分子量の可溶型CD14蛋白質の代表的なアミノ酸配列は配列番号1に示している。すなわち、本発明の第一の態様の抗体はこの配列のC末端に結合する抗体が好ましく、C末端41アミノ酸部分のいずれかに結合する抗体がより好ましい。さらに、C末端41アミノ酸部分以外の部分には結合しないことが好ましい。配列番号1に記載の316番目から328番目のアミノ酸配列または331番目から345番目のアミノ酸配列は、高分子量の可溶型CD14蛋白質に存在し、低分子量の可溶型CD14蛋白質に存在しないアミノ酸配列である。また、配列番号1に記載の316番目から356番目のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対する抗体も本発明の抗体に含まれ、さらに316番目から328番目のアミノ酸配列または331番目から345番目のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対する抗体も本発明の抗体に含まれる。

図2の結果からは配列番号1に記載の316番目から328番目のアミノ酸またはその一部を認識する抗体は、高分子量中のより短い可溶型CD14蛋白質も認識するので分子種の分別に適している。一方、配列番号1に記載の331番目から345番目のアミノ酸またはその一部を認識する抗体は、高分子量の全長可溶型CD14蛋白質のみを分別するのに適している。

本発明の抗体はポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよい。高分子量の可溶型CD14蛋白質を特異的に検出するためには、ある限られたエピトープに対する抗体を使用することが望ましいため、モノクローナル抗体が好ましい。また分子種は特に限定されない。いずれのクラス、サブクラス及びイソタイプに分類される免疫グロブリンであってもよい。また高分子量の可

溶型CD14蛋白質に結合し、低分子量の可溶型CD14蛋白質には結合しない限り、抗体断片も本発明に含まれる。

本発明の抗体は公知技術を用いることにより作製できる。例えば、モノクローナル抗体は下記の方法で作製できる。配列番号1に示されるアミノ酸の配列の全部または一部を有するポリペプチドを免疫原として免疫した哺乳動物の免疫細胞をミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマを作製し、これより高分子量の可溶型CD14蛋白質と結合し、低分子量の可溶型CD14蛋白質を結合しないクローンを選択し、抗体を作製する。

ポリペプチドは、市販のペプチド合成機を用いて調製することができる。免疫する哺乳動物は、特に限定されないが、細胞融合に使用するミエローマ細胞との適合性を考慮して選択することが好ましく、マウス、ラットまたはハムスター等が好ましい。ミエローマ細胞は、公知の種々の細胞が使用可能である。これにはP3、P3U1、SP2/O、NS-1、YB2/O及びY3-Ag1, 2, 3等の骨髓種細胞が含まれる。免疫は公知の方法により行なうことができる。例えば、抗原を腹腔内、皮下、静脈内またはフットパッド内に投与して行なう。この抗原の投与はアジュバントを併用してもよく、また複数回投与することが好ましい。免疫細胞は抗原の最終投与の数日後、例えば3日後に摘出した脾細胞またはリンパ節由来の細胞が好ましい。免疫細胞とミエローマ細胞との融合は、Milstein等の方法(Methods in Enzymol., 73巻、3頁)等の公知の方法を用いて行なうことができる。例えば、融合剤としてポリエチレングリコール(PEG)を使用する方法または電気融合法等が挙げられる。免疫細胞とミエローマ細胞との混合比は、それらが融合できる比率で

あれば限定されないが、免疫細胞に対し、ミエローマ細胞を1/10量～等量を使用することが好ましい。細胞融合をPEG（平均分子量1,000～4,000）を使用して行なう方法ではPEG濃度は特に限定されないが50%で行なうことが好ましい。また、融合効率促進剤としてジメチルスルフォキシド（DMSO）等の補助剤を添加してもよい。融合は37℃に加温したPEG溶液を混合した細胞に添加することにより開始し、1～5分間反応後、培地を添加することにより終了する。この融合により形成されたハイブリドーマをヒポキサンチン、チミジン及びアミノプテリンを含む培地（HAT培地）等の選択培地で1日～7日間培養し、未融合細胞と分離する。得られたハイブリドーマをその産生する抗体により更に選択する。選択したハイブリドーマを公知の限界希釈法に従って単クローン化し、単クローン性抗体産生ハイブリドーマとして樹立する。ハイブリドーマの産生する抗体の活性を検出する方法は公知の方法を使用することができる。例えばELISA法、凝集反応法、ラジオイムノアッセイ法が挙げられる。樹立したハイブリドーマを公知の方法で培養し、その培養上清よりモノクローナル抗体を得ることができる。また、ハイブリドーマをこれと適合性を有する哺乳動物に投与して増殖し、その腹水より得ることができる。抗体の精製は、塩析法、ゲル濾過法、イオン交換クロマト法またはアフィニティークロマト法等の公知の精製手段を用いて行なうことができる。

本発明の抗体の好適な例として、ラットに高分子量の可溶型CD14蛋白質より選択した13～15アミノ酸のペプチドを抗原として免疫した免疫細胞とミエローマ細胞を細胞融合して取得したハイブリドーマF1033-3-1が産生するF1033-3-1抗体、またはF1025-3-1が産生する

F 1 0 2 5 - 3 - 1 抗体が挙げられる。

本発明の第二の態様は、配列番号 1 に記載するアミノ酸配列の 3 1 6 番目から 3 5 6 番目の 4 1 個のアミノ酸配列において、連続した 6 ~ 4 1 アミノ酸からなるポリペプチドである。

上述したように、本発明の第一の態様の抗体は、好ましくは配列番号 1 に記載の 3 5 6 アミノ酸残基の C 末端から 4 1 アミノ酸部分、すなわち 3 1 6 番目のグリシンから 3 5 6 番目のアラニンまでのいずれかに結合し、前記 4 1 アミノ酸以外の部分には結合しない。そのため、これら 4 1 アミノ酸部分のいずれかを有するポリペプチドは、第一の態様の抗体を決定するのに用いる可能性がある。しかし、ポリペプチドに高次構造が発現されるためには、アミノ酸残基が 6 以上であることが必要となる。

故に、本発明の第二の態様の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の 3 1 6 番目のグリシンから 3 5 6 番目のアラニンまでの 4 1 個のアミノ酸配列のうちの、いずれかの連続する 6 ~ 4 1 アミノ酸からなるポリペプチドは、第一の態様の抗体の抗原またはエпитープとしての可能性を持つ。このようなポリペプチドは、例えば、配列番号 1 に記載の 3 1 6 番目から 3 2 8 番目のアミノ酸配列からなるものであれば、後述する実施例に示す F 1 0 2 5 - 3 - 1 抗体の抗原またはエピトープとして使用できる。また、配列番号 1 に記載の 3 3 1 番目から 3 4 5 番目のアミノ酸配列からなるものであれば、後述する実施例に示す F 1 0 3 3 - 3 - 1 抗体の抗原またはエピトープとして使用できる。本発明のポリペプチドは、公知の方法で作製することができ、市販のペプチド合成機を用いて調製することができる。

本発明の第三の態様は、本発明の第一の態様の好ましい例であるF1033-3-1抗体またはF1025-3-1抗体を産生するハイブリドーマである。

本発明のハイブリドーマは本発明の第一の態様に記載した方法により作製することができる。

本発明のハイブリドーマの好ましい例は平成11年2月9日付け（受託番号P-17209）および平成11年3月30日付け（受託番号P-17350）で日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号の工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託し、さらに平成12年9月11日付けで原寄託から国際寄託に移管したそれぞれ受託番号FERM BP-7295及び受託番号FERM BP-7296のハイブリドーマである。

本発明の第四の態様は本発明の第一の態様の抗体を使用することを特徴とする高分子量の可溶型CD14蛋白質を特異的に定性または定量する測定方法である。

本発明の第一の態様である高分子量の可溶型CD14蛋白質に結合し、低分子量の可溶型CD14蛋白質には結合しない抗体を使用して、検体中の高分子量の可溶型CD14蛋白質を他の低分子量の可溶型CD14蛋白質と分別して、高感度、簡便かつ特異的に定性または定量することができる。この高分子量の可溶型CD14蛋白質の代表的なポリペプチドは配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドである。

本発明の測定法における被検物質の検出原理は特に限定されないが、凝集法、サンドイッチ法、固相直接法または固相結合法、競合法等が例示される。この中でも、サンドイッチ法及び競合法が好ましく、特にサンドイッチ法が好

ましい。

凝集法では、抗体を粒子、例えばラテックス粒子や赤血球（例えば羊赤血球）の表面に結合させて、被検物質が存在すると粒子の凝集が生じるようにし、この粒子の凝集の程度を指標として高分子量の可溶型CD14蛋白質を特異的に定性または定量する。

なお、この凝集法では、ラテックスや赤血球以外にも、ゼラチンやマイクロビーズ、カーボン粒子等、一般に用いられている粒子を使用することができる。

また、サンドイッチ法、固相直接法または固相結合法、競合法では、標識された抗体や抗原を使用し、エンザイムイムノアッセイ（EIA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、ケミルミネッセンスイムノアッセイ（化学発光免疫測定法）、フルオロイムノアッセイ（蛍光免疫測定法）、時間分解蛍光免疫測定法（TR-FIA）、イムノクロマトグラフィーアッセイ（ICA）等の原理で測定を行うことができる。

固相直接法では、検体（試料）を直接固相に吸着させ、固相の高分子量のCD14蛋白質非吸着面を、その測定系には影響しないタンパク質、例えばBSA（ウシ血清アルブミン）などでブロッキング処理し、次いで高分子量の可溶型CD14蛋白質を認識する酵素標識抗体を添加し、反応させる。以降は、サンドイッチ法と同様の操作を行ない、検体中の高分子量の可溶型CD14蛋白質を特異的に定性または定量する。

競合法では、使用する抗体が認識する一定量の高分子量の可溶型CD14蛋白質を直接固相に吸着させ、次いでブロッキング処理した後、ここに、高分子量の

可溶型CD14蛋白質を認識する酵素標識抗体と検体（試料）とを添加する。一定時間反応させた後、洗浄して固相に非結合の物質を除去し、発色基質を加えて酵素と反応させる。検体添加による、酵素標識抗体の固相の高分子量の可溶型CD14蛋白質への結合阻害度を測定することにより、検体中の高分子量の可溶型CD14蛋白質を特異的に定性または定量する。

なお、はじめに抗体を固相に吸着させ、酵素標識した高分子量の可溶型CD14蛋白質を検体と同時に添加し、検体添加による標識物の固相化抗体への結合阻害度を測定することにより、検体中の高分子量の可溶型CD14蛋白質を特異的に定性または定量してもよい。

上記以外の方法として、抗原抗体反応を液相中で行ない、後に、抗体を用いた凝集沈降法もしくは物理化学的な手法によって、標識抗体と結合した高分子量の可溶型CD14蛋白質を分離し、高分子量の可溶型CD14蛋白質を特異的に定性または定量する方法もある。また、高分子量の可溶型CD14蛋白質を認識する抗体を標識するのではなく、その抗体を認識する二次抗体を得、それを標識し、抗原抗体反応を行なわせて、高分子量の可溶型CD14蛋白質を特異的に定性または定量することも可能である。

また、本発明の第四の態様の測定方法は、高分子量の可溶型CD14蛋白質から特定の可溶型CD14蛋白質を選択的に定量する目的で使用することもできる。例えば、後述する実施例に示すF1025-3-1抗体とF1033-3-1抗体とを用いて、F1025-3-1抗体により得られる可溶型CD14蛋白質の316番目から356番目のアミノ酸配列の測定量から、F1033-3-1抗体により得られる可溶型CD14蛋白質の331番目から356番目まで

のアミノ酸配列の測定量を差し引くことにより、可溶型CD14蛋白質の316番目から331番目までのアミノ酸配列を分別定量することができる。これらのアミノ酸配列に対応する主な可溶型CD14蛋白質は、それぞれ可溶型CD14 49 kDa蛋白質および可溶型CD14 55 kDa蛋白質、可溶型CD14 55 kDa蛋白質、可溶型CD14 49 kDa蛋白質である。

なお、本発明の第四の態様の測定方法を使用して、本発明の第一の態様の抗体を含むことを特徴とする高分子量の可溶型CD14蛋白質関連疾患の診断試薬またはキットを作成することも可能である。診断試薬またはキットの構成要素として本発明の第一の態様の抗体が必須であるが、その他には、前述した測定の結果を阻害しない限り含まれるものは限定されない。

本発明の第五の態様は、体液中の低分子量の可溶型CD14蛋白質の量を求める分別測定方法である。本分別測定方法は、低分子量の可溶型CD14蛋白質の量を求めることができる測定方法であれば限定されない。例えば、体液中の可溶型CD14蛋白質の総量から体液中の高分子量の可溶型CD14蛋白質の量を差し引くことにより求める方法、体液から可溶型CD14蛋白質を抽出し、さらにその抽出液から高分子量の可溶型CD14蛋白質を除いた液の蛋白質量を測定する方法、または体液中の可溶型CD14蛋白質を電気泳動、HPLC若しくはMS等により分離し、低分子量の可溶型CD14蛋白質を定量する方法等が挙げられる。これら例示した方法において、本発明の第一の態様の抗体を用いることにより簡便に行うことが好ましい。

さらには、本発明の第四の態様の測定方法を使用して低分子量の可溶型CD14蛋白質を測定する方法が好ましい。

本発明の低分子量の可溶型CD14蛋白質を分別測定する方法は、検体中の可溶型CD14蛋白質の総量を測定する工程と、高分子量の可溶型CD14蛋白質を特異的に測定する系により高分子量の可溶型CD14蛋白質の量を測定する工程と、可溶型CD14蛋白質の総量から、高分子量の可溶型CD14蛋白質の量を差し引く工程を含む。検体中に存在する可溶型CD14蛋白質の総量を測定する工程は、本明細書に記載の公知の方法で行うことができる。例えば、上記背景技術において記載した3C10、MEM-18、28C5、23G4のようなすべての可溶型CD14蛋白質と結合する抗体を用いて可溶型CD14蛋白質の総量を測定する。また、他の可溶型CD14蛋白質を認識する物質、具体的に例示すると、2PS、2BP等のレセプターを用いて、可溶型CD14蛋白質を検出してその総量を測定することもできる。

高分子量の可溶型CD14蛋白質を特異的に測定する系により高分子量の可溶型CD14蛋白質の量を測定する工程は、第四の態様の測定方法により行うことができる。

上記の工程で得られた可溶型CD14蛋白質の総量から高分子量の可溶型CD14蛋白質の量を差し引くことにより、検体中の高分子量の可溶型CD14蛋白質を除く全ての可溶型CD14蛋白質の量を得ることができる。ここで高分子量の可溶型CD14蛋白質を除く全ての可溶型CD14蛋白質は低分子量の可溶型CD14蛋白質である。よって、上記手順により検体中の低分子量の可溶型CD14蛋白質を分別定量することができる。なお、上記手順で低分子量の可溶型CD14蛋白質を分別定量する際に、高分子量の可溶型CD14蛋白質、可溶型CD14蛋白質等の各測定キットや測定条件が異なる場合には、前記測定

キットに付属するCD14蛋白質の標準品を用いて、それぞれの測定値を補正することができる。

なお、本発明の分別測定方法によって、分別測定される低分子量の可溶型CD14蛋白質は、主として可溶型CD14 36 kDa蛋白質であるが、実施例12に示すように、ヒト尿の解析で可溶型CD14 36 kDa蛋白質を示す36 kDaのバンド以外に7.7から42 kDaの間に複数のバンドが存在していることが確認されていることから、これらのバンドに該当するものも含む。

本発明は低分子量の可溶型CD14蛋白質を定量することによる低分子量の可溶型CD14蛋白質関連疾患の診断試薬またはキットも含む。本発明の診断試薬またはキットは、本発明の第五の態様の測定方法を工程として含んで測定することを特徴とする。特に検体が血液である場合は、可溶型CD14 36 kDa蛋白質を測定することを特徴とする。また、低分子量の可溶型CD14蛋白質関連疾患として敗血症が例示される。

本発明の診断試薬またはキットの好適例としては、構成要素として、高分子量の可溶型CD14蛋白質のみを分離若しくは測定するための本発明の第一の態様の抗体、及びすべての可溶型CD14蛋白質を測定するための物質を含む診断試薬またはキットが挙げられる。すべての可溶型CD14蛋白質を測定するための物質には、CD14蛋白質のN末端を認識する抗体、CD14に結合するLPS様物質若しくはLPS結合蛋白(LBP)等が挙げられる。これらは公知の抗体等を用いてもよい。

その他には、前述した測定結果を阻害しない限り含まれるものは限定されない。

任意の構成要素として、抗CD14抗体を吸着または化学結合等により固定化させる固相、標識抗体、検体若しくは標識抗体の緩衝液、標識抗体に酵素が使われる場合のその酵素に適した基質及び発色剤、ブロッキング剤、洗浄剤または停止剤等を含む診断試薬またはキットが例示される。

固相としては、マイクロタイタープレート、プラスチックビーズ、磁性粒子またはメンブラン等が挙げられる。

標識抗体はペルオキシダーゼ、オキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、ウロキナーゼ若しくは β ガラクシダーゼ等による酵素標識、アクリジニウム若しくはエクオリン等による化学発光標識、またはFITC等による蛍光標識により標識された抗体が挙げられる。

酵素に対する基質（発色剤）は、ペルオキシダーゼにはテトラベンジジン等、アルカリフォスファターゼにはp-ニトロフェニルフォスフェート等が挙げられる。

本発明の第六の態様は、第五の態様の測定方法を用いた敗血症の診断方法である。

上記説明したように、本発明者らは、敗血症患者において、低分子量の可溶型CD14蛋白質が増加することを確認している。本発明の敗血症の診断方法は、この知見に基づくものであり、第五の態様の分別測定方法により、レシピエントの血中の低分子量の可溶型CD14蛋白質の量を求め、これを正常人の測定結果の平均値をとる等により標準化した正常人の値または正常人の値の範囲と比較することにより行なう。例えば、正常人の平均値+2SDまたは3SDをカットオフ値として、それよりもCD14蛋白質値が高い場合は陽性である等である。ま

た、予め正常人および敗血症患者の低分子量の可溶型CD14蛋白質濃度の値またはその範囲を標準化した値と、各個体のCD14蛋白質の測定値とを比較することにより行うのが好ましい。例えば、正常人の低分子量の可溶型CD14蛋白質値を0～1.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とし、敗血症患者の値を2.3～6 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)として測定値と比較する等である。本発明の敗血症の診断方法に関して、具体的には実施例11に例示する。

なお、第六の態様では、敗血症の診断方法である。本発明の第四および第五の態様の測定方法を、他のCD14蛋白質関連疾患の診断に用いることが可能である。このような可溶型CD14蛋白質関連疾患には高分子量の可溶型CD14蛋白質関連疾患、低分子量の可溶型CD14蛋白質関連疾患または全てのCD14蛋白質関連疾患が含まれる。これらの疾患には関節リウマチ、AIDS、自己免疫疾患、溶血性貧血、腫瘍、アトピー性疾患、アレルギー疾患、サルコイドーシス、マラリア、乾癬が含まれる。

診断は、本発明の測定方法を使用して、CD14蛋白質関連疾患患者の血清、尿または体液中の、あるいは培養上清中の、高分子量の可溶型CD14蛋白質、他の可溶型CD14蛋白質及び全てのCD14蛋白質濃度を同方法により測定した値から低分子量の可溶型CD14蛋白質の量を求め、正常人の測定結果の平均値をとる等により標準化した正常人の値または正常人の値の範囲と比較することにより行なう。比較について具体的には、上記敗血症の診断方法について示した。また、予め疾患または臨床症状により、高分子量の可溶型CD14蛋白質、低分子量の可溶型CD14蛋白質及び全ての可溶型CD14蛋白質濃度の値またはその範囲を標準化した値と、各個体のCD14蛋白質の測定値とを比較す

ることにより行うのが好ましい。

さらに、本発明の第四の態様による測定方法において上述した高分子量の可溶型CD14蛋白質中からの特定のCD14蛋白質の分別定量により得られた結果に基づいて診断を行ってもよい。

他の例示として、上記本発明者等が作製した高分子CD14蛋白質特異的抗体F1025-3-1抗体とF1033-3-1抗体とを用いて、49kDaのCD14蛋白質を分別定量し、該定量値と上記のCD14蛋白質関連疾患との関係を確認できる。

(実施例)

以下に実施例をもって、本発明をいっそう具体的に説明するが、これらは一例として示すものであり、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。また、以下の記載において用いる略号は当該分野において慣例として用いられる略号に基づくものである。また、アミノ酸配列のアミノ酸の番号は配列表の配列番号1に記載の番号を記載した。

実施例1 高分子量の可溶型CD14蛋白質に特異的なペプチドの作製

アミノ酸配列検索ソフトDNASIS（日立ソフトエンジニアリング）を用いてヒトCD14蛋白質配列、サルCD14蛋白質配列、マウスCD14蛋白質配列、ラットCD14蛋白質配列のホモロジー解析を行ったところ、ヒト/サルのホモロジーは94%、ヒト/マウスでは65%、ヒト/ラットでは63%であった。次に高分子量の可溶型CD14蛋白質に特異性を有する抗体を作製するため、配列番号1に記載の316番目のグリシンより356番目のアラニンの間

(以下C末41アミノ酸と記載)のホモロジー解析を行ったところ、ヒト/マウスでは44%、ヒト/ラットでは46%であった。この領域でのホモロジーが44~46%であったことから、マウス、ラットにこの領域に対する特異抗体を産生させられると考え、以下の解析を行った。Chou-Fasman及びRobsonの2次構造予測プログラムを用いて解析を行ったところ、C末41アミノ酸のうち316番目から328番目の配列はコイル構造を有しており抗体を作製する上で優れたエピトープになり得ると考えられた。また、331番目から345番目の配列は疎水性アミノ酸が占める割合が69%と高い結果であったが、構造的には β 構造の中に一部ターン構造を有するコンビネーション構造を取ることが予想されたため、何らかの条件においてはタンパク表面に露出されているものと考え、免疫が可能と判断した。これらのことより配列番号1に記載の316番目から328番目の配列及び331番目から345番目の配列を、免疫に使用する高分子量の可溶型CD14蛋白質特異的なペプチド(以下、ペプチド13及びペプチド15と記載)として選択した。

なお、選択したペプチドをC末端でSH基を介してキャリア蛋白質と結合させるため、C末端にシステインを挿入した。ペプチドの合成はABI432Aペプチド合成機(アプライド)を用いて行った。定法により樹脂よりペプチドの切り出し、C18逆相HPLC(CAPCELL-PAK、資生堂)を用いてペプチドを精製した。

実施例2 合成ペプチドを用いたペプチドキャリア抗原の作製

実施例1で作製したペプチドを蒸留水で10mg/mLに溶解し、10mg/mLのマレイミド化キーホールリンペットヘモシアニン(KLH、PIER

CE) と等量混合した。室温で2時間反応後、NAP-10カラム(ファルマシア)で脱塩しペプチド13キャリア抗原(以下、ペプチド13-KLHと記載)、ペプチド15キャリア抗原(以下、ペプチド15-KLHと記載)を得た。蛋白質濃度は使用したKLH量を液量で割ったものを用いた。

実施例3 組換えヒトCD14蛋白質発現プラスミドの構築

(1) ヒトCD14蛋白質哺乳細胞発現プラスミドの構築

ヒトCD14蛋白質を哺乳細胞で発現させるために、発現プラスミド(pM1650)の構築を行った。すなわち特許国際公開公報WO98/39438に記載のpUCH14P-4よりXbaIおよびHindIIIで切断した遺伝子断片をpcDNA3.1(-)(Invitrogen社)のXbaI/HindIIIサイトに定法に従い挿入し大腸菌JM109(宝酒造)に形質転換し、定法によりクローニングを行いpM1650を得た。

(2) 可溶型ヒトCD14蛋白質変異体哺乳細胞発現プラスミドの構築

配列番号1に記載のアミノ酸配列よりC末端が28アミノ酸短いタイプの可溶型ヒトCD14蛋白質、及び配列番号1に記載のアミノ酸配列の可溶型ヒトCD14蛋白質を哺乳細胞で発現させるために、配列番号1に示したヒト高分子量の可溶型CD14蛋白質の329番目のバリンをコードする配列を翻訳終止コドン配列に変えた発現プラスミド(pM1653)および326番目のアスパラギン、328番目のグリシンをコードする配列をそれぞれグルタミン、バリンをコードする配列に変えることにより、GPIアンカリングされずに直接培養上清中に全長が分泌される発現プラスミド(pM1656)の構築を行った。

前記のpUCH14P-4を鋳型にセンスプライマー: H0176S(CAC

GCCAGAACCTTGTGAGC) (配列番号2) とアンチセンスプライマー: H1148A-49k (GTCAGTGCACAGGCTGGCTATTA GCCGGAG) (配列番号3) あるいはセンスプライマー: H0176S とアンチセンスプライマー: H1140A-M3 (GTCAGTGCACAGGCT GGGACCAACAACGGATTGCATTGA) (配列番号4) を混合し、Ex Taq ポリメラーゼ (宝酒造) を用いて 94℃ 30秒、55℃ 30秒、72℃ 1分のPCR反応を30サイクル行いDNA断片を得た。これらのDNA断片をXho IとApa Iでそれぞれ消化し、実施例3-(1)で作製したpM1650よりXho IとHind IIIで消化し得られるDNA断片 (約5.8kb) およびApa IとHind IIIで消化して得られるDNA断片 (約0.2kb) とライゲーションを行った。次にこれらのライゲーション反応液を大腸菌JM109 (宝酒造) に形質転換し、pM1653及びpM1656を定法によりクローニングした。

次に配列番号1より41アミノ酸短いタイプの可溶型ヒトCD14蛋白質を哺乳細胞で発現させるために、315番目のプロリンをコードする配列の後ろに翻訳終止コドン (TAA、TAG) を挿入した発現プラスミド (pM1657) を作製した。すなわち、311番目のプロリンから315番目のプロリンまでの5アミノ酸をコードする配列に翻訳終止コドン (TAA、TAG) 及びHind III サイト (AAGCTT) を結合したアンチセンスプライマー: H1101A-Hind (CCCAAGCTTCTATTAGAGATCGAGCACTCT) (配列番号5) を設計し、センスプライマー: H0176Sと共にpUCH14-Pを鋳型とし、Ex Taq ポリメラーゼ (宝酒造) を用いて94℃30秒、55℃30

秒、72℃1分のPCR反応を30サイクル行いDNA断片を得た。このDNA断片をXhoIとHindIIIでそれぞれ消化し、pM1650よりXhoIとHindIIIで消化し得られるDNA断片（約5.8kb）とライゲーションを行った。次にこのライゲーション反応液をJM109細胞に形質転換し、pM1657をクローニングした。

実施例4 組換えヒトCD14蛋白質の調製

プラスミド（pM1650、pM1653、pM1656）を用いてDEAE-デキストラン法により組換えヒトCD14蛋白質を調製した。すなわち、COS-1細胞（ATCC CRL1650）を培養し、細胞濃度が70%コンフルエントになった段階でトランスフェクションを行った。トランスフェクションはPromega社Transfection GUIDE記載の方法にしたがって行い、60mm培養プレート当たり6μgのDNAを使用した。組換えヒトCD14蛋白質はトランスフェクションを行った次の日に培地を1%ウシ胎児血清を含むDMEM溶液に交換し、37℃で72時間培養することにより産生させた。培養上清を回収し、その上清を3000回転で遠心後、0.45μmメンブレンにより微粒子を除去した。

組換えヒトCD14蛋白質はSteinmanらにより作製された抗CD14蛋白質モノクローナル抗体3C10（American Type Culture Collectionより入手したATCC228-TIBハイブリドーマより調製した）をHiTrap NHS-activatedカラム（ファルマシア）に樹脂1mLあたり5mg結合し、調製したアフィニティーカラムを使用して精製した。まずカラムを0.1M リン酸緩衝液（pH7.4）で平衡

化し、回収した培養上清をアプライした。アプライ後、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) でカラムを洗浄し、次に0.1 M グリシン塩酸緩衝液 (pH 2.5) で結合した組換えヒトCD14蛋白質を溶出した。溶出液のpHを中性付近に戻した後、凍結乾燥した。次に蒸留水で溶解し、0.076 M リン酸緩衝液 (pH 6.4) で透析し、精製組換えヒトCD14蛋白質を得た。蛋白質濃度はBSAを標準品としてLowry法により算出した。

実施例5 高分子量の可溶型CD14蛋白質特異的モノクローナル抗体の作製

(1) 抗CD14蛋白質モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの取得

(1)-1 ラットモノクローナル抗体の作製

ペプチド13-KLHまたはペプチド15-KLH100 μ gを100 μ Lの生食に溶解し、フロインド完全アジュバント (DIFCO) と等量混合し、Wistarラット8週齢メスの各後足フットパッドに100 μ Lずつ投与した。2週間後、腸骨リンパ節を摘出し細胞融合を行った。すなわち、リンパ節よりセルストレイナー (ファルコン) を用いてリンパ球を分離し、ミエローマ細胞 (Sp2/O-Ag14) と混合後、ポリエチレングリコールを用いて安東民衛・千葉丈ノ著「単クローン抗体実験操作入門」83ページ、1991年 (講談社) にしたがって細胞融合を行った。HAT培地によりハイブリドーマを選択し、1週間後目的の抗体を産生しているハイブリドーマのスクリーニングを行った。

スクリーニングはペプチド15を直接プレートに固相化するELISA法により行った。まず、アミノプレート (白色、住友ベークライト) に0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で0.1 mg/mLに希釈したSulfo-SMCC (PIERCE) を各ウェルに50 μ L添加し、室温で1時間静置した。次にプレー

トをイオン交換水で5回洗浄後、0.1Mリン酸緩衝液（pH7.4）で5 μ g/mLに希釈したペプチド15を各ウエルに50 μ L添加し、37℃で1時間反応した。反応終了後イオン交換水で5回洗浄し、4mg/mLシステアミン、20%ブロッカー（雪印乳業）、0.1%Tween 20を含む0.076Mリン酸緩衝液（pH6.4）（以下PBSと記載）を各ウエルに100 μ L添加し、室温で1時間静置しブロッキングを行った。得られたハイブリドーマからサンプリングした培養上清を各ウエルに添加し37℃で1時間反応させた後、0.05%Tween 20を含む生理食塩水で3回洗浄した。次にペルオキシダーゼ標識抗ラットイムノグロブリン抗体（DAKO）を10%ウサギ血清を含むPBSで1000倍に希釈した溶液を各ウエルに50 μ L添加した。37℃で1時間反応後、同様に5回洗浄し0.01%過酸化水素を含むテトラメチルベンジジン溶液を各ウエルに添加した。室温で10分間反応後、0.5M硫酸溶液で反応を停止した。その結果に基づき、ペプチド15と反応する抗体を産生しているハイブリドーマを含むウエルを11ウエル選択した。次に選択したウエルが組換えヒトCD14蛋白質と反応するか確認を行った。まず0.01M炭酸緩衝液（pH9.5）により実施例3で精製した組換えヒトCD14蛋白質を1 μ g/mLに希釈し、イムノプレート（Maxisorb、NUNC）の各ウエルに50 μ L添加した。37℃で1時間反応後、イオン交換水で5回洗浄し、0.5%BSAを含むPBSを各ウエルに100 μ L添加しブロッキングを行った。次に選択したハイブリドーマからサンプリングした培養上清を各ウエルに添加し37℃で1時間反応させた後、0.05%Tween 20を含む生理食塩水で3回洗浄した。ペルオキシダーゼ標識抗ラットイムノグロブリン抗体（DAK

○) を10%ウサギ血清を含むPBSで1000倍に希釈し各ウエルに50 μ L添加した。37℃で1時間反応後、同様に5回洗浄し0.01%過酸化水素を含むテトラメチルベンジジン溶液を各ウエルに添加した。室温で10分間反応後、0.5M硫酸溶液で反応を停止し、プレート分光光度計(NJ-2100、日本インターメッド)で450nmの吸光度を測定した。その結果、高分子量の可溶性CD14蛋白質と反応したハイブリドーマを含むウエル(F1033-3)を選択し、限界希釈法によりクローニングを行った。10日後、ペプチド15-KLHに対する反応性を指標としてスクリーニングを行った。すなわち、イムノプレート(Maxisorb、NUNC)にKLH、実施例2で作製したペプチド15-KLHをPBSで0.2 μ g/mLに希釈した溶液をそれぞれウエル当たり50 μ L添加し、45℃30分間反応し、固相化した。プレートをイオン交換水で5回洗浄後、0.5%BSAを含むPBSを各ウエルに100 μ L添加することによりブロッキングを行った。クローニング後のハイブリドーマの培養上清を各ウエルに添加し、室温で1時間反応させた後、0.05%Tween 20を含む生理食塩水で3回洗浄した。次に、ペルオキシダーゼ標識抗ラットイムノグロブリン抗体(DAKO)を10%ウサギ血清を含むPBSで1000倍に希釈し各ウエルに50 μ L添加した。室温で1時間反応後、同様に5回洗浄し0.01%過酸化水素を含むテトラメチルベンジジン溶液を各ウエルに添加した。室温で10分間反応後、0.5M硫酸溶液で反応を停止した。プレート分光光度計(NJ-2100、日本インターメッド)で450nmの吸光度を測定した。その結果、KLHとは反応せず、ペプチド15-KLHとのみ反応する抗体産生ハイブリドーマを選択した。選択したハイブリドーマを10%FCS/RP

MI-1640培地 (GIBCO) で培養後、Hybridoma-SFM培地 (GIBCO) で培養し抗体を産生させ、Prosep-Gカラム (BioProcessing) を用いて抗体を精製した。精製したF1033-3-1抗体のサブタイプはラットIgG2aであった。

同様にペプチド13-KLHを投与したラットハイブリドーマのスクリーニングを行い、CD14蛋白質と結合する抗体産生ハイブリドーマF1025-3-1を樹立した。ハイブリドーマをHybridoma-SFM培地 (GIBCO) で培養し、同様に精製した。精製したF1025-3-1抗体のサブタイプはラットIgG1であった。

(1) - 2 HRP標識抗体の作製

0.5mgのペルオキシダーゼ (東洋紡) を蒸留水に溶解し、蒸留水で溶解した100mMの過ヨウ素酸を添加し25℃で20分間反応した。反応終了後1.5%エチレングリコールを添加し25℃で10分間反応後1mM酢酸緩衝液 (pH4.4) に対して透析した。精製F1033-3-1抗体及びF1025-3-1抗体を10mM炭酸緩衝液 (pH9.5) で透析し、0.5mgに対して1M炭酸緩衝液 (pH9.5) を添加して活性化した0.5mgのペルオキシダーゼをそれぞれの抗体と等量に混合し25℃で2時間反応した。4mg/mLの水素化ホウ素ナトリウムを添加しさらに2時間4℃で反応した。反応液をPBSに透析しペルオキシダーゼ標識抗体を得た。液量を測定し使用した抗体量より抗体濃度を算出した。

(1) - 3 抗体の特異性の確認

作製したモノクローナル抗体 (F1033-3-1及びF1025-3-1)

の特異性を確認した。まず、投与したペプチドと特異的に結合するか確認するため、イムノプレート (Maxisorb、NUNC) にKLH、ペプチド13-KLH、ペプチド15-KLHをPBSで0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈し、各ウエルに50 μL を添加し、45℃30分間反応させ抗原を固相化した。次に、イオン交換水で洗浄後、0.5%BSAを含むPBSを各ウエルに100 μL 添加することによりブロッキングを行った。精製したF1033-3-1抗体及びF1025-3-1抗体をPBSで1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈し各ウエルに50 μL 添加した。37℃で1時間反応させた後、0.05%Tween 20を含む生理食塩水で3回洗浄した。次に、ペルオキシダーゼ標識抗ラットイムノグロブリン抗体 (DAKO) を10%ウサギ血清を含むPBSで1000倍に希釈した溶液を各ウエルに50 μL 添加した。37℃で1時間反応後、同様に5回洗浄し0.01%過酸化水素を含むテトラメチルベンジジン溶液を各ウエルに50 μL 添加した。室温で10分間反応後、0.5M硫酸溶液で反応を停止した。プレート分光光度計 (NJ-2100、日本インターメッド) で450nmの吸光度を測定した。図1に示すようにF1033-3-1抗体はKLH、ペプチド13-KLHには反応せずペプチド15-KLHとのみ反応したことから、本抗体はペプチド15と特異的に反応することが明らかになった。同様にF1025-3-1抗体はKLH、ペプチド15-KLHには反応せずペプチド13-KLHとのみ反応したことから、本抗体はペプチド13と特異的に反応することが明らかになった。

次に、各種組換えヒトCD14蛋白質を用いてF1033-3-1抗体及びF1025-3-1抗体の特異性を検討した。すなわち、イムノプレート (Max

i s o r b、NUNC) にC末端28アミノ酸を持たない可溶型CD14蛋白質 (pM1653より調製、以下CD14蛋白質タイプAと記載)、配列番号1に示した全長型の高分子量の可溶型CD14蛋白質 (pM1656より調製、以下CD14蛋白質タイプBと記載) 及びC末端41アミノ酸を持たない可溶型CD14蛋白質 (pM1657より調製、以下CD14蛋白質タイプCと記載) をPBSで0.2 μ g/mLに希釈し各ウエルに50 μ L添加し、37℃で1時間反応させ組換えヒトCD14蛋白質を固相化した。イオン交換水で5回洗浄後、0.5%BSAを含むPBSを各ウエルに100 μ L添加することによりブロッキングを行った。F1033-3-1抗体及びF1025-3-1抗体をPBSで1 μ g/mLに希釈し、各ウエルに添加した。37℃で1時間反応させた後、0.05%Tween20を含む生理食塩水で3回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗ラットイムノグロブリン抗体(DAKO)を10%ウサギ血清を含むPBSで1000倍に希釈し各ウエルに50 μ L添加した。37℃で1時間反応後、同様に5回洗浄し0.01%過酸化水素を含むテトラメチルベンジジン溶液を各ウエルに添加した。室温で10分間反応後、0.5M硫酸溶液で反応を停止した。プレート分光光度計(NJ-2100、日本インターメッド)で450nmの吸光度を測定した。図2に示すように高分子量の可溶型CD14蛋白質タイプA及びタイプBを認識するF1025-3-1抗体は両方ともに結合し、C末端41アミノ酸短い低分子量の可溶型CD14蛋白質タイプCには結合しなかったが、F1033-3-1抗体はタイプBの高分子量の可溶型CD14蛋白質とのみ結合した。以上より、F1033-3-1抗体は特異的にタイプBの高分子量の可溶型CD14蛋白質のみを認識し、F1025-3-1抗体はタ

イプA及びBの高分子量の可溶型CD14蛋白質のみを認識することが明らかになった。

実施例6 F1033-3-1及びF1025-3-1抗体のエピトープ解析

実施例5で作製したF1033-3-1及びF1025-3-1抗体の認識する高分子量の可溶型CD14蛋白質中のアミノ酸配列（以下、エピトープと記載）を明らかにするため、SPOTsシステム（CAMBRIDGE RESEARCH BIOCHEMICALS社）を用いてエピトープマッピングを行った。すなわち、CAMBRIDGE RESEARCH BIOCHEMICALS社のマニュアルに従い、CD14蛋白質のアミノ酸配列（配列番号1）に基づき246番目のアミノ酸バリンより346番目のアミノ酸スレオニンまでを間を2アミノ酸づつずらしたペプチド鎖を合成し、10アミノ酸の長さを持つペプチド鎖46種類をメンブレン上に合成した。合成の終了したペプチド鎖の側鎖の脱保護を行い、指定の方法によりブロッキングを行った。次にF1033-3-1またはF1025-3-1抗体をブロッキングバッファーで5 μ g/mLに希釈した溶液中でメンブレンを室温で6時間反応させた。反応終了後、メンブレンをT-TBSで2回洗浄し、続けてブロッキングバッファーで500倍に希釈した β -ガラクトシダーゼ標識抗ラットIgG-F(ab')₂抗体（American Qualex社）と4℃で一晩反応させた。反応液を捨て、T-TBSで2回、PBSで2回洗浄し β -ガラクトシダーゼ用基質を加え、室温で約30分間反応させた。次にメンブレンをPBSで2回洗浄して反応を停止し、メンブレンの写真を撮影した。その結果、F1033-3-1抗体は表1に示すように45番目及び46番目のペプチド鎖で強い発色が認められ、認識する

エピトープ配列は配列番号1に記載の配列の336番目から343番目の配列の Ser Thr Leu Ser Val Gly Val Ser を含む配列（配列番号6）であることが明らかになった。

表1

SPOT No.	アミノ酸配列	発色強度
44	Ala Cys Ala Arg Ser Thr Leu Ser Val Gly	—
45	Ala Arg <u>Ser Thr Leu Ser Val Gly Val Ser</u>	++
46	<u>Ser Thr Leu Ser Val Gly Val Ser</u> Gly Thr	+

F1033-3-1抗体の認識するエピトープをSPOTsを用いて合成したペプチド鎖との反応性により、メンブレン上の発色強度で解析した結果を示したものである。下線は反応したペプチド鎖の共通配列を示したものである。

また、F1025-3-1抗体は表2に示すように35番目から37番目のペプチド鎖で強い発色が認められ、認識するエピトープ配列は配列番号1に記載の配列の318番目から323番目の配列のAla Leu Pro His Glu Gly を含む配列（配列番号7）であることが明らかになった。

表2

SPOT No.	アミノ酸配列	発色強度
35	Val Pro Gly Thr <u>Ala Leu Pro His Glu Gly</u>	+
36	Gly Thr <u>Ala Leu Pro His Glu Gly</u> Ser Met	++
37	<u>Ala Leu Pro His Glu Gly</u> Ser Met Asn Ser	+

F1025-3-1抗体の認識するエпитープをSPOTsを用いて合成したペプチド鎖との反応性により、メンブレン上の発色強度で解析した結果を示したものである。下線は反応したペプチド鎖の共通配列を示したものである。

実施例7 抗CD14蛋白質モノクローナル抗体の作製

実施例4で作製した3C10アフィニティーカラムを用いて正常人血清中の可溶性CD14蛋白質を精製し、投与抗原とした。タンパク濃度はBSAを標準品にしてタンパク定量(BIORAD)を行い、濃度を算出した。

免疫はラットとマウスを用いて行い、ラットについてはフットパッドに抗原100 μ gを、マウスについては腹腔に抗原20 μ gをフロインド完全アジュバント(DIFCO)と等量混合して投与した。ラットについては投与2週間後、実施例5で記載した方法により細胞融合を行い、HAT培地によりハイブリドーマを選択した。次に、ELISA法を用いて抗体を産生しているハイブリドーマをスクリーニングした。すなわち、精製可溶性CD14蛋白質を0.01M炭酸緩衝液(pH9.5)にて1 μ g/mLに希釈し50 μ Lをイムノプレート(Maxisorb, NUNC)の各ウェルに分注後、37℃1時間

反応させ、抗原を固相化した。プレートをイオン交換水で5回洗浄後、0.5% BSA/PBSを100 μ L添加することによりブロッキングを行った。ブロッキング液を捨て、ハイブリドーマの培養上清を50 μ L添加し37℃で1時間反応させた。次に、0.05% Tween 20を含む生理食塩水で3回洗浄後、10%ウサギ血清を含むPBSでペルオキシダーゼ標識抗ラットイムノグロブリン抗体(DAKO)を1000倍に希釈し、各ウエルに100 μ L添加した。37℃1時間反応後、洗浄し、0.01%過酸化水素を含むテトラメチルベンジジン溶液を各ウエルに50 μ L添加し、10分後、0.5M硫酸溶液で反応を停止し450 nmの吸光度を測定した。その結果より、固相化した可溶型CD14蛋白質と反応した抗体を産生するハイブリドーマを選択し、限界希釈法によりクローニングを行った。10日後、同様にスクリーニングを行い、抗CD14蛋白質モノクローナル抗体25種類を得た。

マウスについては初回投与2週間後に抗原20 μ gを生食に溶解し、フロインド不完全アジュバント(DIFCO)と等量混合後、腹腔に投与した。1週間後、抗体価の上昇を上記記載のELISA法により確認した。マウスの腹腔に抗原100 μ gを投与し最終投与を行い、3日後、脾臓を摘出した。脾臓よりリンパ球を分離し、ミエローマ細胞(P3 \times 63-Ag. 8. U. 1)と10:1で混合しポリエチレングリコールを用いて細胞融合を行った。HAT培地によりハイブリドーマを選択し、1週間後目的の抗体を産生しているハイブリドーマのスクリーニングを上記記載のELISA法により行った。固相化した可溶型CD14蛋白質と反応したハイブリドーマを限界希釈法によりクローニングし、10日後同様にスクリーニングを行い、抗CD14蛋白質モノクローナル抗体33種

類を得た。

得られた抗体を実施例5に記載の方法により培養し、同様に精製抗体を作製した。

実施例8 サンドイッチELISA系の作製

(1) 組み合わせが可能な抗体の検索

F1033-3-1抗体及びF1025-3-1抗体とサンドイッチELISAを作製可能な抗体を検索するため、実施例7で作製した各精製抗体を $10\mu\text{g}/\text{mL}$ にPBSで希釈しイムノプレート (Maxisorb、NUNC) の各ウェルに $50\mu\text{L}$ 添加し 45°C 30分間反応し抗体を固相化した。イオン交換水で洗浄後、 0.5% BSAを含むPBSを各ウェルに $100\mu\text{L}$ 添加することによりブロッキングを行った。ブロッキング液を廃棄し、次に 0.1% BSA/PBSで精製可溶型CD14蛋白質を $100\text{ng}/\text{mL}$ に希釈したものを $50\mu\text{L}$ 添加した。ブランクには 0.1% BSA/PBSを使用した。 25°C で1時間反応後、 0.05% Tween20を含む生理食塩水で3回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識F1033-3-1抗体またはペルオキシダーゼ標識F1025-3-1抗体を 10% ラット血清を含むPBSで $1\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈し各ウェルに $50\mu\text{L}$ 添加した。 37°C で1時間反応後、同様に5回洗浄し 0.01% 過酸化水素を含むテトラメチルベンジジン溶液を各ウェルに添加した。室温で10分間反応後、 0.5M 硫酸溶液で反応を停止した。プレート分光光度計 (NJ-2100、日本インターメッド) で 450nm の吸光度を測定した。その結果、F1033-3-1抗体とサンドイッチELISA系が作製可能な抗体としてF1023-1-1 (ラットIgG1)、F1031-7-1 (マウス

I g G 1)、3 C 1 0 抗体が選択された。同様に F 1 0 2 5 - 3 - 1 抗体とサンドイッチ E I A 系が作製可能な抗体として F 1 0 2 3 - 1 - 1 (ラット I g G 1)、3 C 1 0 抗体が選択された。

(2) サンドイッチ E L I S A 系の確立

精製 F 1 0 2 3 - 1 - 1 抗体を 0. 0 1 M 炭酸緩衝液 (pH 9. 0) で 1 0 μ g / m L に希釈し、イムノプレート (M a x i s o r b、N U N C) の各ウェルに 5 0 μ L 添加した。2 5 $^{\circ}$ C で 1 時間反応後、イオン交換水で 5 回洗浄し、0. 5 % B S A を含む 0. 0 5 M リン酸緩衝液 (pH 7. 4) (以下 P B S (-) と記載) を各ウェルに 1 0 0 μ L 添加することによりブロッキングを行った。高分子量の可溶型 C D 1 4 蛋白質標準品を 1 % C D 1 4 蛋白質吸収血清、0. 1 % B S A を含む P B S (-) で希釈し、0 から 1 0 0 n g / m L の希釈系列を作成した。検体は 0. 1 % B S A を含む P B S (-) で 1 0 0 倍に希釈した。標準品希釈系列または希釈した検体をウェル当たり 2 5 μ L 添加し、さらに希釈液を 2 5 μ L 添加した後、2 5 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。次に、0. 0 5 % T w e e n 2 0 を含む生理食塩水で 3 回洗浄し、1 0 % ラット血清、0. 1 % T w e e n 2 0 を含む P B S (-) で 0. 5 ~ 2 μ g / m L に希釈したペルオキシダーゼ標識 F 1 0 3 3 - 3 - 1 抗体またはペルオキシダーゼ標識 F 1 0 2 5 - 3 - 1 抗体を各ウェルに 5 0 μ L 添加した。2 5 $^{\circ}$ C で 1 時間反応後、同様に 5 回洗浄し 0. 0 1 % 過酸化水素を含むテトラメチルベンジジン溶液を各ウェルに添加した。室温で 2 0 分間反応後、0. 5 M 硫酸溶液で反応を停止した。プレート分光光度計 (N J - 2 1 0 0、日本インターメッド) で 4 5 0 n m の吸光度を測定し、標準曲線を作成した。図 3 及び図 4 に作成した標準曲線を示した。測定感度

はそれぞれ0.5 ng/mL (ブランク+3SD)であり、高感度で簡便な測定系が実現された。また、作成したサンドイッチELISA系の特異性を確認するため上記の系に実施例4で調製した組換えヒトCD14蛋白質を用いて測定を行った。その結果、F1033-3-1抗体を用いた測定系はタイプBの高分子量の可溶型CD14蛋白質でのみ標準曲線が作成され、タイプAの高分子量の可溶型CD14蛋白質とは反応せず、本系の特異性が確認された。また、F1025-3-1抗体を用いた測定系ではタイプA、Bの高分子量の可溶型CD14蛋白質で標準曲線が作成できた。

実施例9 血中の高分子量の可溶型CD14蛋白質の測定

正常人40例(男性20例、女性20例)、敗血症患者10例について血清測定を行った。また、IBL社(Humburg)のsCD14蛋白質ELISAキットを用いて可溶型CD14蛋白質の総量を測定した。F1023-1-1/F1033-3-1抗体を用いた測定系で測定結果(55 kDaの量)と可溶型CD14蛋白質の総量を比較したところ、正常人では可溶型CD14蛋白質の総量と55 kDaタイプの量の間には相関係数 $r = 0.78$ と高い相関が認められた。一方、敗血症患者では、図5に示すように敗血症患者では相関は認められなかった。以上の結果より、正常人では血中の可溶型CD14蛋白質の主要部分は可溶型CD14 55 kDa蛋白質であり、敗血症患者では55 kDaタイプのCD14蛋白質も上昇するが、55 kDaタイプのCD14蛋白質測定系では検出されない低分子量の可溶型CD14蛋白質が変動していることが示唆された。

実施例10 血中の可溶型CD14蛋白質の解析

(1) 各種CD14蛋白質－ELISA系を用いた正常人の血中の可溶型CD14蛋白質の分別定量

正常人血清中の可溶型CD14蛋白質のそれぞれのサブタイプを分別定量する目的で血清中よりそれぞれのサブタイプを分離し、作製した抗体を用いた免疫測定系により測定した。

まず、正常人血清約20mLを遠心後、0.45 μ mのメンブレンでろ過し、全てのサブタイプと結合することができる3C10抗体を結合したカラムに供した後、0.1M Glycine-HCl (pH3.0)で溶出した。溶出分画を回収し、280nmの吸光度より蛋白濃度を算出した。

次に精製した可溶型CD14蛋白質 (82 μ g/mL) と3種類の抗体を混合し、それぞれの抗体に特異的な可溶型CD14蛋白質のサブタイプを吸収した。すなわち、精製した可溶型CD14蛋白質 5 μ gと3C10、1025-3-1または1033-3-1抗体13.6 μ gを混合し4℃で18時間反応させた。それぞれの溶液にプロテインGが結合した樹脂 (Prosep G、ミリポア) を20 μ L程度添加し室温で1時間振とうし、sCD14蛋白質/抗体複合体をトラップした。反応液の上清を回収し、実施例8に記載の方法に準じて高分子量の可溶型CD14蛋白質量を測定したところ、3C10抗体では全てのsCD14蛋白質が吸収され、1025-3-1または1033-3-1抗体では97%のsCD14蛋白質が吸収された。以上のことより血清中の低分子量の可溶型CD14蛋白質の含有量は3%程度であることが明らかになった。

(2) 血中の低分子量の可溶型CD14蛋白質の分離、検出

ヒト血清由来の可溶型CD14蛋白質を抗ヒトCD14蛋白質抗体（3C10）を結合したアフィニティー精製用カラム（HiTrapカラム（Amersham Pharmacia Biotech社））に供して選択的に吸着させ、pH勾配にて溶出した。得られた溶出画分はただちにpH8.0の1M HEPES緩衝液にて中和し、pHを中性とした。各画分はHRP-conjugated 3C10を用いたEIA法により検定し、CD14蛋白質改変体ポリペプチドの含まれる画分を選択した。次にヒト血清由来の可溶型CD14蛋白質からヒト血清由来の低分子量の可溶型CD14蛋白質を以下に従って精製した。55kDaのCD14蛋白質を認識する抗体（F1033-3-1）を結合したアフィニティー精製用カラム（HiTrapカラム（Amersham Pharmacia Biotech社））、次に49kDaを認識する抗体（F1025-3-1）を結合したアフィニティー精製用カラムに供してステップワイズに精製した。得られた溶出画分及び未吸着画分は凍結乾燥法にて濃縮し、抗CD14蛋白質抗体を用いたEIA法により濃度を測定した。

得られたヒト血清由来の可溶型CD14蛋白質の各分画の分子量を抗ヒトCD14蛋白質抗体（3C10およびMEM-18）を用いたWestern blottingにより確認した。すなわち、得られたヒト血清由来の可溶型CD14蛋白質の各分画30ng/laneをSDS-polyacrylamide gradient gel（5-20% ATTO社）で電気泳動し、PVDF膜（日本ミリポア社）にタンパクを転写した後、0.5% Skim Milkを含むPBS（-）30mlにて室温で1時間ブロッキング反応を行い、10μg/mlの3C10および100倍希釈のMEM-18を添加して室温で

1時間反応させた。さらにHRP-conjugated抗マウスIg抗体と室温で30分間反応させた後、ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech社)を用いて検出した。分析結果を図6に示す。

その結果、ヒト血清由来の高分子量の可溶型CD14蛋白質は49 kDa、55 kDaの位置 (Lane 1) に、ヒト血清由来の低分子量の可溶型CD14蛋白質は36 kDaの位置にバンドが検出された (Lane 2)。

なお、ヒト血清由来の可溶型CD14蛋白質 (Lane 1) において36 kDaの分子が検出されないのは49 kDa、55 kDaの分子に比べ、ヒト血清由来の可溶型CD14蛋白質に含まれる36 kDaの分子が微量のためである。

実施例 11 正常人、敗血症患者における低分子量の可溶型CD14蛋白質の挙動

正常人、敗血症患者血清を用いて、血中の可溶型CD14蛋白質の総量をIBL社 (Humburg) の可溶型CD14蛋白質ELISAキットを用いて測定した。また、実施例8に記載の高分子量の可溶型CD14蛋白質測定系を用いて高分子量の可溶型CD14蛋白質のみを測定した。両キットの測定値を比較するため、IBL社 (Humburg) の可溶型CD14蛋白質ELISAキットで使用されている標準品を高分子量の可溶型CD14蛋白質測定系を用いて測定し、標準品の測定値を比較したところ、補正值として高分子量の可溶型CD14蛋白質測定値 $\times 2.16$ が算出された。この補正值を使用して、高分子量の可溶型CD14蛋白質測定系で測定した測定値を補正し、IBL社 (Humburg) のsCD14蛋白質ELISAキットで測定した総量から高分子量の可溶型CD14蛋白質を差し引き、低分子量の可溶型CD14蛋白質を求めた。図7

に結果を示したが、正常人では低分子量の可溶型CD14蛋白質はほとんど検出されないのに対して、敗血症患者では高値傾向を示し、低分子量の可溶型CD14蛋白質は敗血症患者の新規マーカーとなりえることが明らかになった。

実施例12 ヒト尿中の低分子量の可溶型CD14蛋白質の分離、検出

0.22 μ mのPVDF膜で尿中の不溶物を除去した後、抗ヒトCD14抗体(3C10)を結合したアフィニティー精製用カラム(CNBR-activated Sepharose™ 4 FastFlowカラム(Amersham Pharmacia Biotech社))に供して選択的に吸着させ、pH勾配にて溶出した。得られた画分はただちに7.5%のSodium Bicarbonate緩衝液にて中和し、pHを中性とした。各画分はHRP-conjugated 3C10を用いたEIA法により検定し、ヒト尿中可溶型CD14蛋白質の含まれる画分を選択した。

次にヒト尿中可溶型CD14蛋白質からヒト尿中の低分子量の可溶型CD14蛋白質の精製は、可溶型CD14蛋白質の316番目から345番目を認識する抗体(F1025-3-1)を結合したアフィニティー精製用カラムを供してステップワイズに行った。得られた溶出画分および未吸着画分は凍結乾燥法にて濃縮し、抗ヒトCD14抗体を用いたEIA法により濃度を測定した。

ヒト尿中の低分子量の可溶型CD14蛋白質の解析は実施例10(2)に従って、Western blottingにより確認した。

その結果、高分子量の可溶型CD14蛋白質は、49から55 kDaの間に検出され、低分子量の可溶型CD14蛋白質は36 kDaの位置のバンドを

含め、7.7から42 kDaの間に複数のバンドが検出された。このことは、尿中にも血中と同様に高分子量の可溶型CD14蛋白質と低分子量の可溶型CD14蛋白質が存在していることを示している。

産業上の利用可能性

本発明により、高分子量の可溶型CD14蛋白質の抗体が得られた。また該抗体を用いることにより、高分子量の可溶型CD14蛋白質の高感度、高精度及び高い特異性の検出または定量が簡便に行なえるようになった。さらには該抗体を用いることにより、低分子量の可溶型CD14蛋白質を分別定量することが可能となった。本発明により、敗血症等の可溶型CD14蛋白質または低分子量の可溶型CD14蛋白質が指標となる疾患を簡便に診断することが可能になった。

請 求 の 範 囲

1. 体液中の低分子量の可溶型CD14蛋白質の分別測定方法。
2. 下記(A)～(C)の工程を含む請求項1に記載の分別測定方法。
 - (A) 可溶型CD14蛋白質の総量を測定する工程、
 - (B) 高分子量の可溶型CD14蛋白質を特異的に測定する系により高分子量の可溶型CD14蛋白質の量を測定する工程、および
 - (C) 可溶型CD14蛋白質の総量から、高分子量の可溶型CD14蛋白質の量を差し引く工程。
3. 低分子量の可溶型CD14蛋白質が可溶型CD14 36 kDa蛋白質である請求項1または2に記載の分別測定方法。
4. 体液中の低分子量の可溶型CD14蛋白質を測定することを含む敗血症の診断方法。
5. 高分子量の可溶型CD14蛋白質に特異的に結合し、低分子量の可溶型CD14蛋白質には結合しない抗体。
6. 配列番号1に記載のアミノ酸配列からなる全長可溶型CD14蛋白質のC末端41アミノ酸部分のいずれかに結合する請求項5に記載の抗体。
7. C末端41アミノ酸部分のいずれかが配列番号1に記載の316番目から328番目のアミノ酸配列または331番目から345番目のアミノ酸配列である請求項5に記載の抗体。
8. 高分子量の可溶型CD14蛋白質が可溶型CD14 49 kDa蛋白質及び／または可溶型CD14 55 kDa蛋白質であり、低分子量の可溶型

CD14蛋白質がCD14 36 kDa蛋白質である請求項5の抗体。

9. ハイブリドーマ受託番号FERM BP-7295または受託番号FERM BP-7296により産生される抗体。

10. 配列番号1に記載のアミノ酸配列の316番目から356番目の41個のアミノ酸配列において、連続した6～41アミノ酸からなるポリペプチド。

11. 請求項5～9のいずれかに記載の抗体を産生するハイブリドーマ。

12. 受託番号FERM BP-7295または受託番号FERM BP-7296である請求項11のハイブリドーマ。

13. 請求項5～9のいずれかに記載の抗体を使用することを特徴とする高分子量の可溶型CD14蛋白質を特異的に定性または定量する測定方法。

14. (B)の高分子量の可溶型CD14蛋白質の量を測定する工程が、請求項12に記載の高分子量の可溶型CD14蛋白質を特異的に定量する方法を含むことを特徴とする請求項2に記載の分別測定方法。

1 / 4

FIG. 1

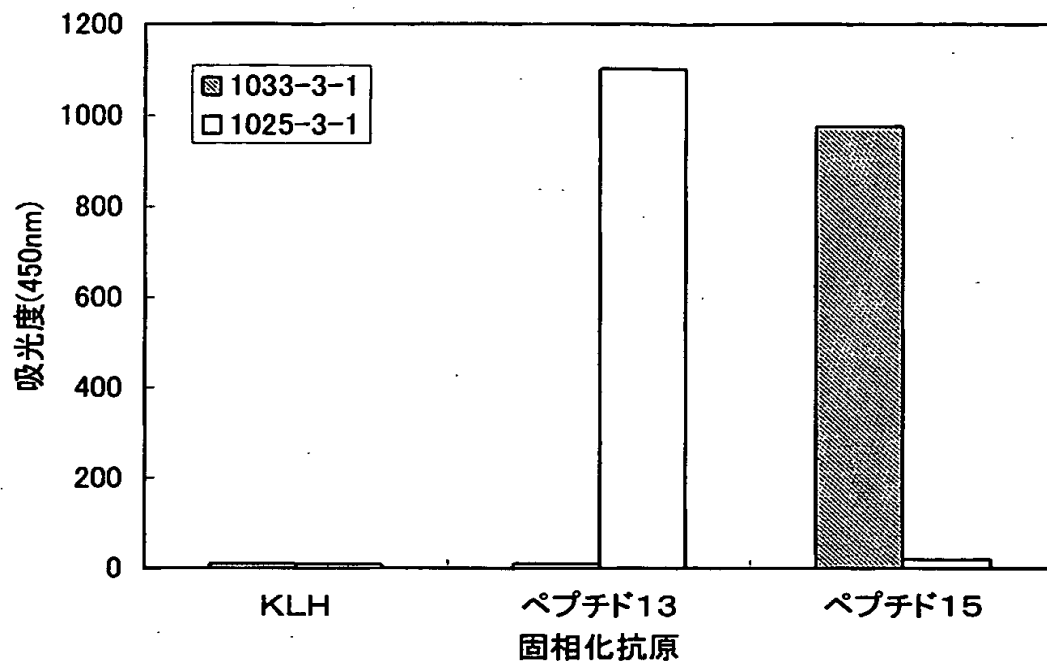
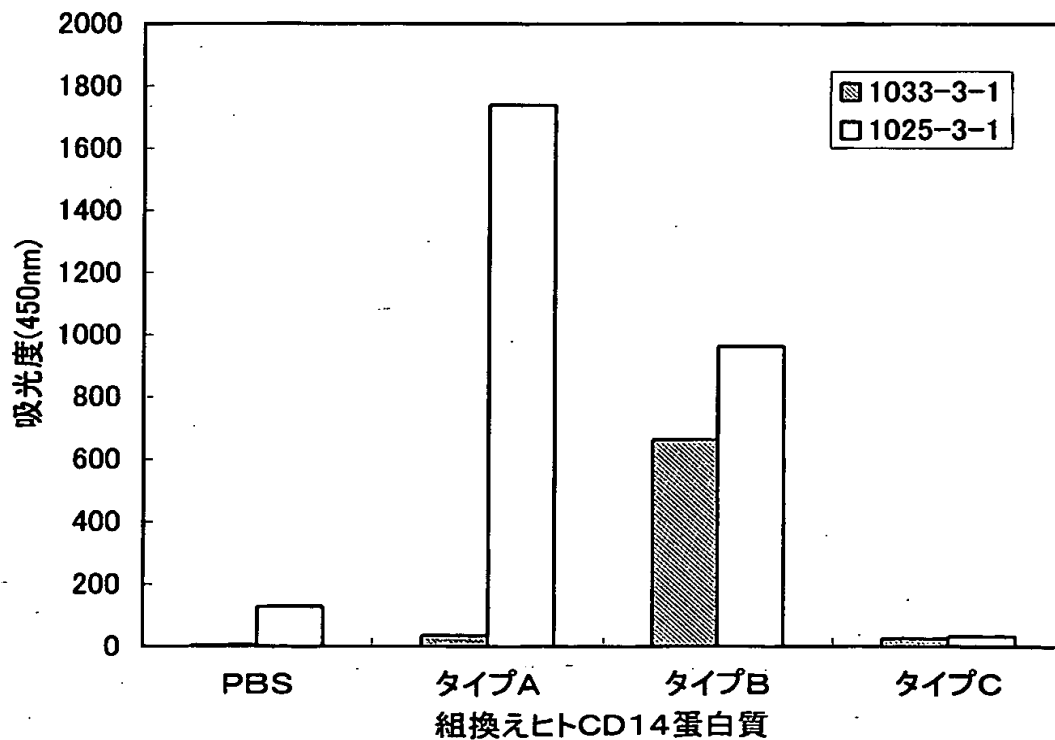


FIG. 2



THIS PAGE BLANK (USPTO)

2 / 4

FIG. 3

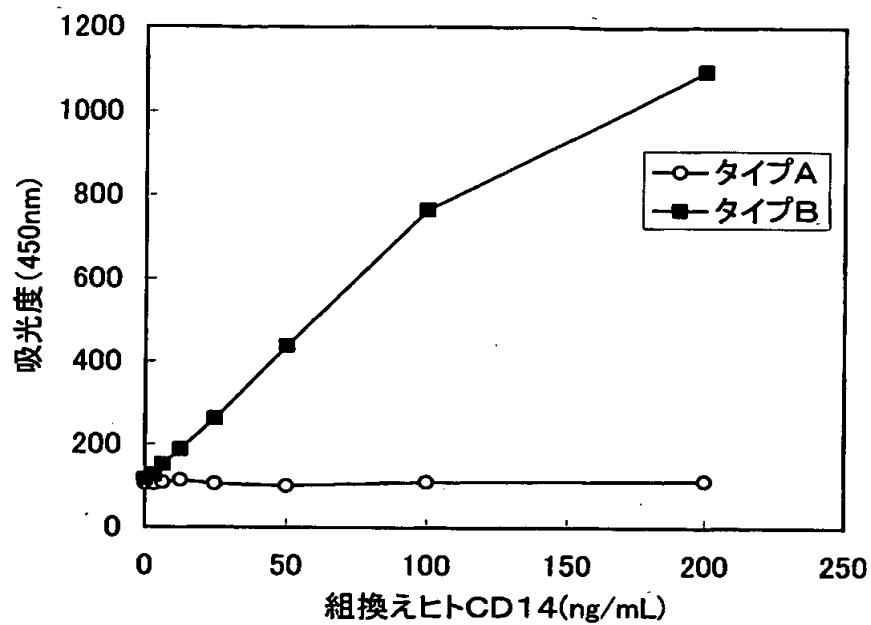
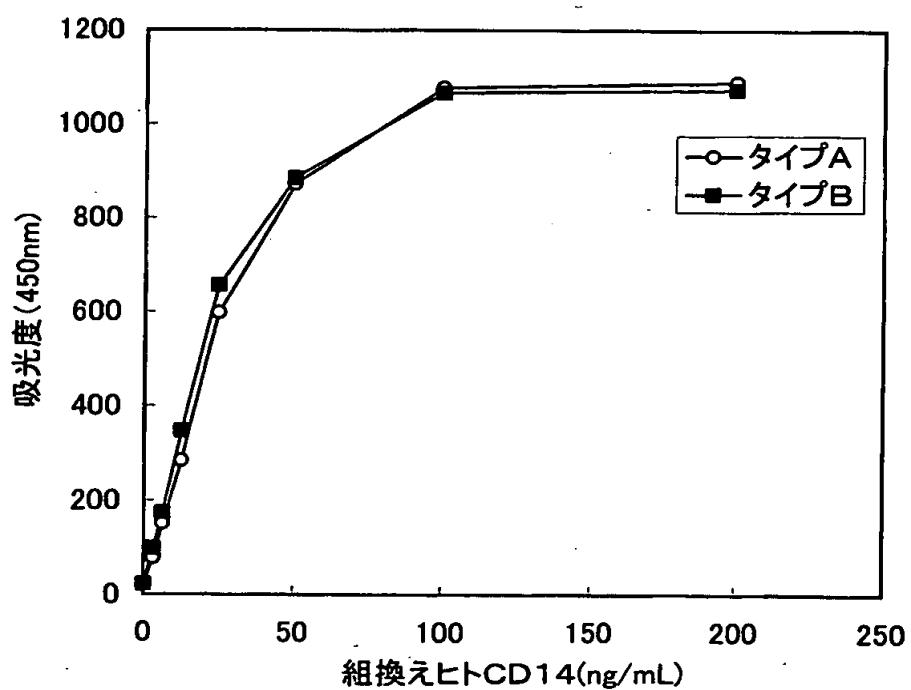


FIG. 4



THIS PAGE BLANK (USPTO)

3 / 4

FIG. 5

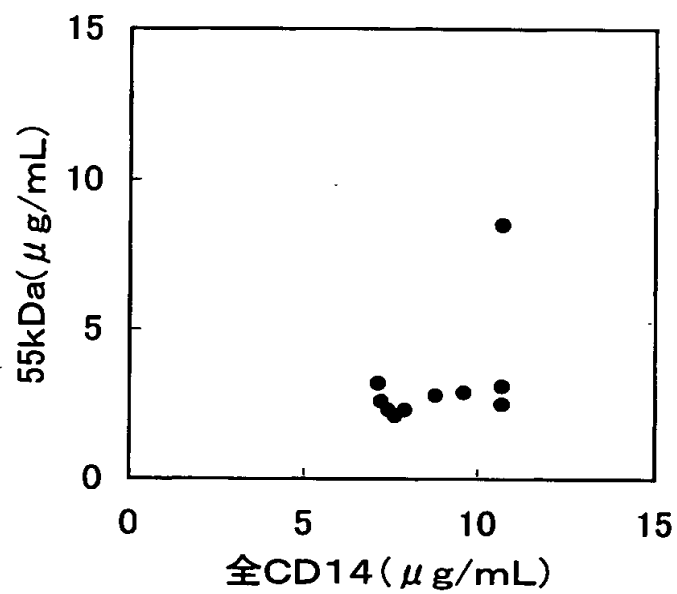
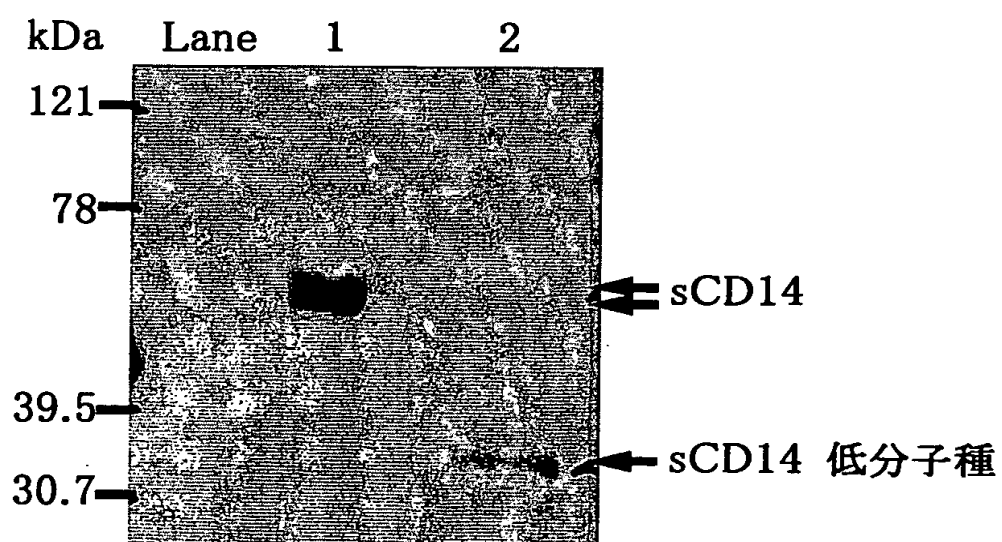


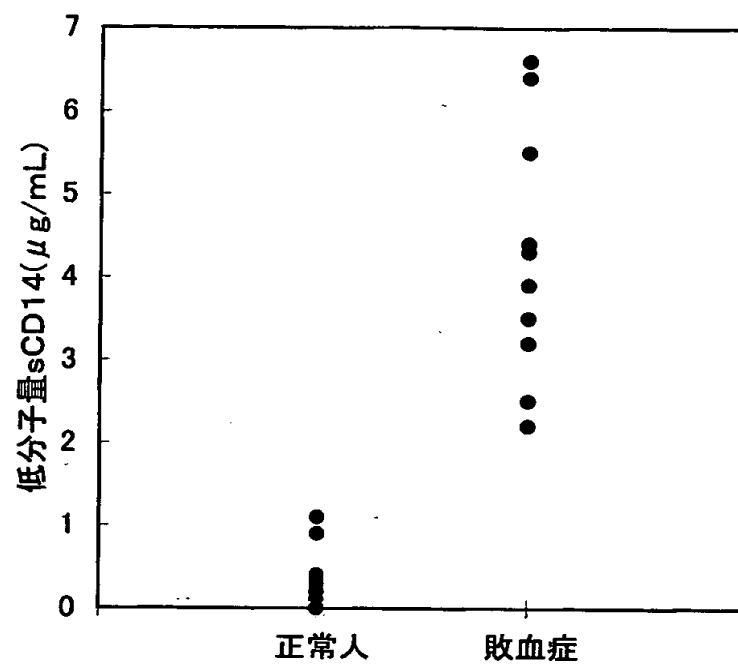
FIG. 6



THIS PAGE BLANK (USPTO)

4 / 4

FIG. 7



THIS PAGE BLANK (USPTO)

配 列 表

<110> Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Separate measuring method of soluble CD 14 protein

<130> MD 0 5 6 0

<160> 7

<210> 1

<211> 356

<212> PRT

<213> human

<400> 1

Thr Thr Pro Glu Pro Cys Glu Leu Asp Asp Glu Asp Phe Arg Cys Val Cys Asn
Phe Ser Glu Pro Gln Pro Asp Trp Ser Glu Ala Phe Gln Cys Val Ser Ala Val
Glu Val Glu Ile His Ala Gly Gly Leu Asn Leu Glu Pro Phe Leu Lys Arg Val
Asp Ala Asp Ala Asp Pro Arg Gln Tyr Ala Asp Thr Val Lys Ala Leu Arg Val
Arg Arg Leu Thr Val Gly Ala Ala Gln Val Pro Ala Gln Leu Leu Val Gly Ala
Leu Arg Val Leu Ala Tyr Ser Arg Leu Lys Glu Leu Thr Leu Glu Asp Leu Lys
Ile Thr Gly Thr Met Pro Pro Leu Pro Leu Glu Ala Thr Gly Leu Ala Leu Ser
Ser Leu Arg Leu Arg Asn Val Ser Trp Ala Thr Gly Arg Ser Trp Leu Ala Glu
Leu Gln Gln Trp Leu Lys Pro Gly Leu Lys Val Leu Ser Ile Ala Gln Ala His
Ser Pro Ala Phe Ser Cys Glu Gln Val Arg Ala Phe Pro Ala Leu Thr Ser Leu

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2 / 4

Asp Leu Ser Asp Asn Pro Gly Leu Gly Glu Arg Gly Leu Met Ala Ala Leu Cys
Pro His Lys Phe Pro Ala Ile Gln Asn Leu Ala Leu Arg Asn Thr Gly Met Glu
Thr Pro Thr Gly Val Cys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Gly Val Gln Pro His Ser
Leu Asp Leu Ser His Asn Ser Leu Arg Ala Thr Val Asn Pro Ser Ala Pro Arg
Cys Met Trp Ser Ser Ala Leu Asn Ser Leu Asn Leu Ser Phe Ala Gly Leu Glu
Gln Val Pro Lys Gly Leu Pro Ala Lys Leu Arg Val Leu Asp Leu Ser Cys Asn
Arg Leu Asn Arg Ala Pro Gln Pro Asp Glu Leu Pro Glu Val Asp Asn Leu Thr
Leu Asp Gly Asn Pro Phe Leu Val Pro Gly Thr Ala Leu Pro His Glu Gly Ser
Met Asn Ser Gly Val Val Pro Ala Cys Ala Arg Ser Thr Leu Ser Val Gly Val
Ser Gly Thr Leu Val Leu Leu Gln Gly Ala Arg Gly Phe Ala

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

CACGCCAGAACCTTGTGAGC

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3 / 4

<400> 3

GTCAGTGCACAGGCTGGCTATTAGCCGGAG

<210> 4

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

GTCAGTGCACAGGCTGGGACCACAACGGATTGCATTGA

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

CCCAAGCTTCTATTAGAGATCGAGCACTCT

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> human

<400> 6

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4 / 4

Ser Thr Leu Ser Val Gly Val Ser

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> human

<400> 7

Ala Leu Pro His Glu Gly

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06359

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N33/53, 33/68, 33/577, C07K16/28, 14/705

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N33/53, 33/68, 33/577, C07K16/28, 14/705

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2000
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2000	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2000

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS, JOIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 5-501399, A (Scripps Clinic and Research Foundation), 18 March, 1993 (18.03.93) & EP, 485430, A	1-3, 5-14
A	JP, 8-510909, A (The Scripps Research Institute), 19 November, 1996 (19.11.96) & EP, 751962, A	1-3, 5-14
A	JP, 10-505839, A (The Scripps Research Institute), 09 June, 1998 (09.06.98) & EP, 792162, A	1-3, 5-14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
06 December, 2000 (06.12.00)

Date of mailing of the international search report
19 December, 2000 (19.12.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06359

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 4
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
It pertains to diagnostic methods.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐
☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ G01N33/53, 33/68, 33/577, C07K16/28, 14/705

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ G01N33/53, 33/68, 33/577, C07K16/28, 14/705

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2000年
日本国登録実用新案公報	1994-2000年
日本国実用新案登録公報	1996-2000年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
BIOSIS, JOIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 5-501399, A (スクリップス クリニック アンド リサーチ ファウンデーション) 18. 3月. 1993 (18. 03. 93) & EP, 485430, A	1-3, 5-14
A	JP, 8-510909, A (ザ スクリップス リサーチ イン スティテュート) 19. 11月. 1996 (19. 11. 96) & EP, 751962, A	1-3, 5-14
A	JP, 10-505839, A (ザ スクリップス リサーチ イ ンスティテュート) 9. 6月. 1998 (09. 06. 98)	1-3, 5-14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06. 12. 00

国際調査報告の発送日

19.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

亀田 宏之

2J

9015

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	&EP, 792162, A	

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 4 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
診断方法である。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

THIS PAGE BLANK (USPTO)